Aus dem Physiologischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. R. Jacob
Lehrstuhl I: Professor Dr. med. E. Betz

Permeabilitätsänderungen der Arterienwand im Initialstadium experimenteller Atherosklerose

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
VOLKHARD LINDNER
aus Gevelsberg

1984

Univ.
Leipzig
Inst.

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. R. Jacob
Lehrstuhl I: Professor Dr. med. E. Betz

Permeabilitätsänderungen der Arterienwand im Initialstadium experimenteller Atherosklerose

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
VOLKHARD LINDNER
aus Gevelsberg

1984

Dekan:	*Professor Dr. med. G. Fichtner*
1. Berichterstatter:	*Professor Dr. med. E. Betz*
2. Berichterstatter:	*Professor Dr. med. L. Seipel*

---

gedruckt bei H.- J. Köhler · Reprografischer Betrieb · Tübingen

Die Arbeit wurde durch eine Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft Be 324/13 ermöglicht.

INHALT

		Seite
1.	Einleitung	8
1.1.	Definition und Bedeutung der Atherosklerose	8
1.2.	Untersuchungen zur Gefäßwandpermeabilität an Tiermodellen	9
1.2.1.	Zum Begriff der Permeabilität	9
1.2.2.	Transportwege für Proteine durch das Endothel	9
1.2.3.	Bestimmung der Permeabilität	10
1.2.3.1.	Körperfremde Makromoleküle	10
1.2.3.2.	Kovalent markierte Plasmaproteine	11
1.2.3.3.	Vitalfarbstoffe	12
1.2.4.	Aussagen der Permeabilitätsstudien in bezug auf die Atherosklerose	13
1.3.	Ziel der vorliegenden Arbeit	16
2.	Materialien und Meßmethoden	19
2.1.	Evans-Blau als Tracer	19
2.2.	Analysenverfahren zum Bindungsverhalten von Evans-Blau an Proteine	19
2.2.1.	Gelchromatographie	19
2.2.2.	Elektrophoresesysteme	20
2.2.2.1.	Elektrophoresen auf Celluloseacetatfolie	20

2.2.2.2.	Elektrophoresen auf Disc-Flachgelen für die Horizontalelektrophorese	21
2.2.2.3.	Elektrophoresen von Aortenhomogenaten und direkte Gewebselektrophoresen von Carotis- und Aortengewebe	27
2.2.2.4.	Auswertung der Elektrophoresen	28
2.2.3.	Nachweis der Fluoreszenz im Gewebe mit dem Fluoreszenzmikroskop anhand von Gefrierschnitten	29
2.3.	Beschreibung von Operations- und Untersuchungsabläufen	30
2.3.1.	Versuchstiere	30
2.3.2.	Elektrostimulation der Arterienwand	30
2.3.3.	Untersuchungstechnik mit Evans-Blau als Tracer	32
2.3.4.	Versuche zum Bindungsverhalten von Evans-Blau im Plasma und in der Arterienwand	33
2.3.5.	Versuche zum Bindungsverhalten von Evans-Blau im elastischen Gewebe	33
2.3.6.	Quantitative Albuminbestimmung in der A.carotis communis nach Elektrostimulation	34
3.	Ergebnisse	36
3.1.	Bindungsverhalten von Evans-Blau im Plasma	36

3.1.1.	Untersuchung mit der Gelchromatographie	36
3.1.2.	Untersuchung mit der Elektrophorese auf Celluloseacetatfolien	36
3.1.3.	Untersuchung mit der Disc-Elektrophorese	37
3.2.	Bindungsverhalten von Evans-Blau im Gewebe	45
3.2.1.	Bindungsverhalten von Evans-Blau in Gefäßwänden	45
3.2.2.	Bindungsverhalten von Evans-Blau in elastischem Gewebe	49
3.3.	Gefrierschnitte der A.carotis communis nach in vivo Evans-Blau Perfusion	49
3.3.1.	Gefrierschnitte der Kontrollseite	50
3.3.2.	Gefrierschnitte der elektrisch stimulierten Seite	51
3.4.	Bestimmung des Albumingehaltes in stimulierter und nicht stimulierter A.carotis communis	60
4.	Diskussion	62
4.1.	Allgemeine Methodenkritik	62
4.2.	Evans-Blau	63
4.2.1.	Bindungsverhalten von Evans-Blau im Gewebe und Plasma	63
4.2.2.	Gefrierschnitte nach elektrischer Stimulation	67

4.3. Albumingehalt der A.carotis communis unter dem Einfluß der Elektrostimulation 70

5. Zusammenfassung 71

6. Literaturverzeichnis 74

1. EINLEITUNG

1.1. Bedeutung und Definition der Atherosklerose

Welche Bedeutung der Atherosklerose zukommt, wird daran deutlich, daß 50% aller Todesursachen in der westlichen Welt auf kardiovaskuläre Erkrankungen entfallen, von denen wiederum 60% auf Atherosklerose zurückzuführen sind. Die Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) für die Atherosklerose besagt, daß es sich dabei um eine variable Kombination von Veränderungen der Arterienintima handelt, die mit einer herdförmigen Anhäufung von Lipiden, komplexen Kohlehydraten, Blut und Blutbestandteilen, mit der Bildung eines fibrösen Gewebes und mit Kalkablagerungen einhergeht und mit Veränderungen der Media verknüpft ist.
Einigkeit herrscht heute darüber, daß am Beginn der Atherosklerose das Intimaödem steht. Dieses Ödem enthält alle Bestandteile des Plasmas und ist daher die Folge einer Permeabilitätssteigerung des Endothels. Die Erkenntnisse, die man bei der menschlichen Atherosklerose gewinnen kann, beschränken sich zumeist auf die Beschreibung von morphologischen Befunden, die man post mortem erhebt. Rückschlüsse auf den Einfluß einzelner Faktoren für die Entstehung der Gefäßwandveränderungen sind daher nur begrenzt möglich. Man ist folglich bei experimentellen Untersuchungen auf Tiermodelle angewiesen, wobei sich dann allerdings die Frage stellt, in welchem Ausmaß

die Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind.

1.2. Untersuchungen zur Permeabilität an Tiermodellen

1.2.1. Zum Begriff der Permeabilität

Die Permeabilität eines Endothels beschreibt eine Eigenschaft dieser Zellschicht und gibt an, in welchem Ausmaß der Durchtritt für bestimmte Stoffe pro Zeiteinheit möglich ist. Da das Intimaödem durch Plasmainsudation zustande kommt, wird dieses Initialstadium der Atherosklerose vorwiegend im Zusammenhang mit einer Permeabilitätsänderung des Endothels für Proteine diskutiert.

1.2.2. Transportwege für Proteine durch das Endothel

Mit verschiedenen Tracern wurde gezeigt, daß für Proteine vor allem zwei Transportwege in die Gefäßwand in Betracht kommen:

1) der transzelluläre Transport durch die Endothelzellen hindurch mit Vesikelbildung (Stein und Stein, 1972)
2) der Transport durch Diffusion entlang von Interzellularspalten durch unvollständige Tight junctions und Gap junctions (Hüttner et al.,1973).

Proteine mit hohem Molekulargewicht werden bevorzugt vesikulär transportiert, während für kleinere Proteinmoleküle auch der Transport durch Interzellularspalten von Bedeutung ist.

1.2.3. Bestimmung der Permeabilität

Der Durchtritt von Proteinen aus dem Lumen in die Gefäßwand läßt sich mittels geeigneter Tracer verfolgen, wobei sowohl körperfremde Makromoleküle als auch derivatisierte Plasmaproteine Verwendung finden.

1.2.3.1. Körperfremde Makromoleküle

Körperfremde Makromoleküle wie Ferritin, Katalase (Venkatachalam und Fahimi,1969) und Peroxidase dienten nach intravenöser Applikation der Untersuchung der Proteintransportwege (Hüttner et al.,1973). In der Arbeitsgruppe von Jellinek (Kerényi et al.,1978) wurde ein Natrium-Eisengluconatkomplex (Ferrlecit^{R}, Nattermann, Köln) verwendet. All diese Verbindungen lassen sich durch Elektronenmikroskopie oder mit spezifischen Reaktionen direkt nachweisen, stellen aber unphysiologische, körperfremde Substanzen dar, so daß aus den damit erzielten Ergebnissen nicht unbedingt auf die Transportwege körpereigener Proteine geschlossen werden kann. Zum Beispiel bewirkt Peroxidase eine Histaminfreisetzung, was eine Permeabilitätssteigerung zur Folge hat. Auch im Handel erhältliche Dextrane, an die Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind, und Polyvinylpyrrolidon lassen sich für Permeabilitätsstudien verwenden. Aber auch bei Dextranen sind allergische Reaktionen (Histaminfreisetzung) möglich, da diese Substanzen aus Bakterien isoliert werden.

1.2.3.2. Kovalent markierte Plasmaproteine

Klatzo et al. (1962) und Steinwall u. Klatzo (1966) verwendeten Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Rhodaminisothiocyanat (RITC) markiertes Serumalbumin für Permeabilitätsstudien an der Blut-Hirn-Schranke. Ein weiterer Tracer ist das Fluorescamin (Fluram^{R}, Roche), das sich an primäre Aminogruppen von Proteinen bindet. Auch ^{131}J-markiertes Albumin und Fibrinogen (Adams et al.1970, Bell et al.1974a, Bell et al.1974b, Packham et al.1967) wurden für Permeabilitätsstudien verwendet. Die oben genannten Tracer einschließlich des ^{131}Jod besitzen alle den Vorteil, kovalent an das Protein gebunden zu sein, so daß eine Dissoziation des Konjugationsproduktes nur schwer möglich ist. Dies hat zur Folge, daß beim Nachweis tracerspezifischer Fluoreszenz bzw. Radioaktivität unmittelbar auf das Vorhandensein des Konjugationsproduktes geschlossen werden kann. Günstig ist außerdem, daß die Konjugationsprodukte nur zum Teil artfremde Substanzen sind und damit nicht nennenswert unphysiologische Verhältnisse darstellen. Von Nachteil ist allerdings, daß die Proteine erst isoliert werden müssen und die Kopplungsreaktion selbst teilweise mit Proteindenaturierung verbunden ist.

1.2.3.3. Vitalfarbstoffe

Diese Farbstoffe, die direkt intravasal appliziert werden können und reversibel an Proteine binden, finden vielseitige Anwendung sowohl in Experimenten über die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke als auch in der Gefäßwand. Am häufigsten verwendet werden Evans-Blau und sein Isomer Trypan-Blau, beides Diazofarbstoffe mit einem Molekulargewicht von ungefähr 960 Daltons.
Zum Teil widersprüchliche Angaben werden in der Literatur über das Bindungsverhalten von Evans-Blau an Plasmaproteine gemacht. Rawson (1943) zeigte, daß sich Evans-Blau vollständig an Albumin bindet, solange die Bindungskapazität (8-14 mol Evans-Blau/ mol Albumin) nicht überschritten wird. Unter der Annahme, daß pro kg Körpergewicht etwa 2g Albumin vorhanden sind, entspricht dies einer Konzentration von 250-400mg Evans-Blau pro kg Körpergewicht. Markus und Baumberger (1954) berichten, daß 10mg Evans-Blau an 25mg Protein (Albumin) gebunden werden, was umgerechnet etwa einer Konzentration von 800mg Farbstoff pro kg Körpergewicht entspricht. Hansen und Nielson (1964) konnten bei Konzentrationen von 0,5mg Evans-Blau pro kg Körpergewicht mit Hilfe der Gelchromatographie (Sephadex G-25) kein freies Evans-Blau nachweisen. Packham et al. (1967) gelang es auch nicht, bei einer zehnfach höheren Konzentration (5mg/kg) freies Evans-Blau nachzuweisen. Clasen et al. (1970) dagegen

fordert, daß allein aufgrund der reversiblen Bindung zwischen Protein und Evans-Blau immer ein bestimmter Betrag an freiem Farbstoff vorhanden sein muß, was durch einfache Anwendung des Massenwirkungsgesetzes einsichtig ist.

1.2.4. Aussagen der Permeabilitätsstudien in bezug auf die Atherosklerose

Bevor ein Überblick über die Permeabilitätsverhältnisse bei manifester Atherosklerose gegeben wird, soll kurz auf den Befund beim intakten, nicht atherosklerotisch veränderten Gefäß eingegangen werden.
Die Verwendung von radioaktiv markierten Plasmaproteinen ermöglichte eine exakte quantitative Bestimmung dieser Proteine in den einzelnen Gefäßwandschichten (Caro et al. 1980, Bratzler et al. 1977). Bei dieser Methode muß man allerdings in Kauf nehmen, daß nur die radioaktiv markierten Proteine erfaßt werden und nicht markierte unberücksichtigt bleiben. Smith und Staples (1980) konnten an Menschenaorten, die unmittelbar post mortem untersucht wurden, zeigen, daß z.B. die Albuminkonzentration in der Intima 20% und in der inneren Media 7,3% der Plasmakonzentration beträgt. Gegen die Adventitia zu, also in der äußeren Media, steigt die Albuminkonzentration wieder an. Ein ähnliches Proteinverteilungsmuster findet sich auch für andere Plasmaproteine. Der sprunghafte Konzentrationsabfall der Proteine am Endothel und

an der Lamina elastica interna macht deutlich, daß sowohl dem Endothel als auch der Lamina elastica interna eine Barrierefunktion für Plasmaproteine zukommt.

Transmissionselektronenmikroskopische, fluoreszenzmikroskopische, autoradiographische und histochemische Untersuchungen mit Markersubstanzen unterschiedlicher Molekülgröße weisen auf eine erhöhte Permeabilität des Endothels im atherosklerotisch veränderten Gefäß hin (Adams et al. 1968, Adams et al. 1977a, Somer und Schwartz 1972b).

Eine Anhäufung von Peroxidase in atheromatösen Proliferaten fand Kurozumi (1975), was möglicherweise durch eine Zunahme des interzellulären Transportes verursacht wird (Schmid 1981). Für Ferritin beobachtete Kurozumi (1975) einen erhöhten vesikulären Transport in atheromatösen Plaques. Zudem zeigen Untersuchungen über den Lipoproteintransport (Stefanovich und Gore 1971, Duncan et al. 1963) und Lipidstoffwechsel (Somer und Schwartz 1974) in atherosklerotischen Gefäßen deutliche Unterschiede gegenüber dem normalen Gefäß. Björkerud (1974) führte Permeabilitätsstudien am regenerierenden Endothel durch, indem er künstlich Endothelnudationen unterschiedlicher Stärke an der Aorta von Kaninchen erzeugte. Dabei stellte er fest, daß es nach vorübergehender Intimaverdickung zur vollständigen Regeneration kommt, wenn der Endotheldefekt innerhalb kurzer Zeit wieder repariert werden kann. Erfolgt die Endothelregeneration über längere Zeit, kommt es an dieser Stelle zu Schaumzellbildung. Andauernde

Unterbrechung der Barrierefunktion und damit andauernde Erhöhung der Permeabilität des Endothels für Plasmabestandteile führen demnach zu frühen atherosklerotischen Läsionen.

Für Permeabilitätsuntersuchungen an Arterien wurde Evans-Blau bei einer Vielzahl von Versuchstieren angewendet, unter anderem bei Kaninchen, Schweinen, Katzen, Ratten (Björkerud und Bondjers 1972) und Hunden (McGill et al. 1957). Spontanes Anfärben nach in vivo Injektion des Farbstoffs beobachtet man regelmäßig an einigen Stellen der Gefäßwände. Besonders Gefäßabschnitte, die unter stärkerer hämodynamischer Belastung stehen, färben sich nach in vivo Injektion von Evans-Blau an (Stehbens 1978). Dies erklärt auch die Befunde von Bell et al. (1972) und Somer u. Schwartz (1971), die besagen, daß Areale um Gefäßabgänge von der Aorta, z.B. Intercostalarterien, und der Aortenbogen selbst vermehrt Farbstoff einlagern. Auch erhöhter intravasaler Druck und gesteigerte Gefäßwandbelastungen, z.B. durch Scherkräfte und Turbulenzen in der Blutstrombahn, führen zu verstärkter Aufnahme von Evans-Blau in diesen Gefäßabschnitten (Fry 1969). Ähnliche Befunde liegen proximal von künstlich erzeugten Aortenstenosen vor (Somer et al. 1972a). Der Zusammenhang zwischen erhöhtem intravasalem Druck und Anfärbung mit Evans-Blau wird zusätzlich durch die Ergebnisse von Hüttner et al. (1972) und Jellinek (1974) erklärt, die bei Bluthochdruck einen gesteigerten transendothelialen Transport von Plasmaproteinen nachwiesen. Während Crane

und Ingle (1964) an Stellen erhöhter mechanischer Belastung (z.B. Gefäßverzweigungen) eine vermehrte Mitoseaktivität in Media-, Adventitia- und Intimazellen beobachteten, konnten wright et al. (1975), Wright u. Payling (1972) und Caplan u. Schwartz (1973) sogar zeigen, daß die erhöhte Regenerationsrate des Endothels in Gefäßverzweigungen und atherosklerotischen Plaques auch mit einer Evans-Blau Anfärbung einhergeht.
Eine Korrelation zwischen Anfärbung mit Evans-Blau und gesteigerter Permeabilität des Endothels wurde für ^{3}H-Cholesterin (Somer und Schwartz 1971 u. 1972b, Adams et al. 1968), ^{131}J-Fibrinogen (Bell et al. 1974b) und Albumin (Packham et al. 1967, Adams et al. 1970, Bell et al. 1974a) nachgewiesen. Für die Fragestellung dieser Arbeit sollen die hier genannten Ergebnisse aus Untersuchungen mit Evans-Blau zunächst genügen.

1.3. Ziel der vorliegenden Arbeit

Die bisher beschriebenen Untersuchungen zeigen deutlich die Schwierigkeiten, wenn es darum geht, initiale Veränderungen der Permeabilität festzustellen:
Bei systemischen Modellen (Cholesterinfütterung) läßt sich die Stelle der Plaqueentwicklung nicht voraussagen, so daß nur Vorgänge an manifesten Intimaproliferaten untersucht werden können. Bei den bisherigen Modellen, bei denen eine Läsion an einer gewünschten Stelle erzeugt werden kann, geschieht dies durch Zerstörung des

Endothels. Da einerseits die Atherogenese beim Menschen nicht mit einer vergleichbaren Endotheldenudation verbunden ist, andererseits nach Wegfall der ersten Diffusionsbarriere sicher andere Permeabilitätsverhältnisse zu erwarten sind, scheinen solche Modelle zur Untersuchung initialer Permeabilitätsänderungen nicht geeignet.

In dieser Arbeit wurde das Tiermodell der Atherosklerose, wie es von Betz und Schlote (1979) beschrieben wurde, verwendet. In diesem Modell wird auf die Arteria carotis communis von Kaninchen transmural eine Folge von elektrischen Reizen appliziert. Der Vorteil dieses Modells besteht darin, daß initiale Stadien der Atherogenese untersucht werden können, eine Abstufung der Reize möglich ist und daß der Reiz genau lokalisiert appliziert werden kann. Eitel et al. (1980) beobachteten an der Reizstelle mit dem Elektronenmikroskop (SEM und TEM) ein zwar verändertes, aber nach morphologischen Kriterien intaktes Endothel. Die weitere Entwicklung der atherosklerotischen Plaque in diesem Modell wurde eingehend beschrieben (Betz und Schlote 1979, Eitel et al. 1980, Schlote et al. 1980).
Das hier verwendete Modell scheint also im morphologischen Verlauf der menschlichen Atherosklerose sehr nahe zu kommen und bietet sich deshalb an für Untersuchungen zur Fragestellung, inwieweit ein Stimulus, der chronisch appliziert atherogen wirkt, in seiner initialen Wirkung die Permeabilität der Gefäßwand beeinflußt.

Es sollte daher unter Verwendung von fluoreszenzmarkiertem Albumin, entweder nach in vitro Reaktion mit geeigneten Tracern oder in vivo Kopplung mit Evans-Blau, der Proteineinstrom in die gereizte Gefäßwand untersucht werden. Der Nachweis der markierten Proteine sollte durch Fluoreszenzhistologie an Gewebeschnitten erfolgen. Im Falle des Evans-Blau galt es zu klären, wie die Bindungsverhältnisse des Farbstoffs im Plasma sind, weshalb mit elektrophoretischen Methoden Plasmaanalysen gemacht wurden. Beim Bindungsverhalten von Evans-Blau in der Gefäßwand sollte der Frage nachgegangen werden, ob dem Farbstoff bei der Bindung ein bestimmtes Protein zugeordnet werden kann. Dazu waren Gewebselektrophoresen notwendig, die mit kleinsten Proteinmengen funktionstüchtig sein sollten. Deshalb mußte in Anlehnung an herkömmliche Methoden ein Verfahren entwickelt werden, daß die Durchführung von Gewebselektrophoresen auf dünnen Gelen (1mm) ermöglichte.

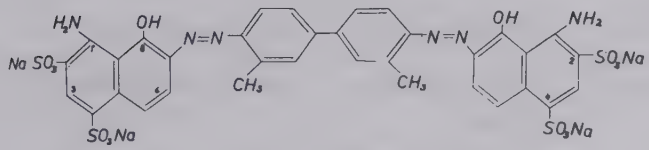
Die Verwendung von kovalent markiertem Albumin bzw. Plasma erwies sich als wenig nützlich, da die starke Eigenfluoreszenz der Gefäßwand die Auffindung des Tracers sehr beeinträchtigte. Deshalb soll auf diese Versuche im folgenden nicht weiter eingegangen werden.

2. Materialien und Methoden

Zuerst sollen die Analysenmethoden zur Charakterisierung des Evans-Blau Bindungsverhaltens im Plasma und in der Gefäßwand beschrieben werden und danach die Versuche am Tiermodell.

2.1. Evans-Blau als Tracer

Evans-Blau wurde in 2, 2,5 und 5%iger Lösung (Masse/Volumen) eingesetzt. Der Farbstoff war in sterilem Wasser bzw. in steriler NaCl-Lösung gelöst, so daß sich eine isotone (300mosmol/l) Lösung ergab.



EVANS BLUE (T 1824)

Abb.1.

2.2. Analyseverfahren zum Bindungsverhalten von Evans-Blau an Protein

2.2.1. Gelchromatographie

Mit Hilfe der Gelchromatographie sollte die Bindung von Evans-Blau im Plasma untersucht werden. Aufgrund des

Molekularsiebeffektes sollten hochmolekulare Protein-Farbstoff-Komplexe vom freien Farbstoff getrennt werden. Es wurden Sephadex G-25 (Säulenmaße 16 x 200mm) und Biogel P-100 (Säulenmaße 4 x 30mm) verwendet. Als Elutionsmittel diente jeweils physiologische Kochsalzlösung. Das Eluat wurde in Fraktionen aufgefangen.

2.2.2. Elektrophoresesysteme

Als weiteres proteinanalytisches Verfahren wurden Elektrophoresen angewendet, die im folgenden beschrieben werden.

2.2.2.1. Elektrophoresen auf Celluloseacetatfolie (Desaga 146696)

Reagentien:
1) Barbitalpuffer (pH 8,6; Ionenstärke 0,075)
2) Ponceau-S-Farbe und Fixiermittel (1,8%)
3) Essigsäure 5%
4) Entfärbelösung (Eisessig/Essigsäureäthylester 70:30)

zu 1): Herstellen des Barbitalpuffers
0,331g Diäthylbarbitursäure und 1,848g Na-Diäthylbarbiturat werden in 120ml destilliertem Wasser gelöst.

zu 2): Ponceau-S-Farbe
Zu 1000ml dest. Wasser werden 0,9g Ponceau-S,

13,4g Trichloressigsäure und 13,4g Sulfosalicylsäure gegeben.

Die Proteine werden 20 min lang in der Elektrophoresekammer (Desaphor, Desaga, Heidelberg) bei 100 Volt (Netzgerät: Desatronic 2000/300, Desaga) aufgetrennt. Zum Färben wurden die Folien 10 min lang in Lösung 2) gelegt. Zum Entfärben wurden sie je 2 min lang in 3 Bäder mit Entfärbelösung gelegt und anschließend getrocknet.

2.2.2.2. Elektrophoresen auf Disc-Flachgelen für die Horizontalelektrophorese

Die Gele entsprechen im wesentlichen in ihrer Zusammensetzung den von Maurer (1971) beschriebenen Rundgelen.
Material für die Gelform:

Glasplatten (Fensterglas, 2mm dick) im Format 10 x 10cm
Parafilm
Paraffin, flüssig (Merck 7162)
Desaga Polyfix 1000 (Desaga 146638)
Gummi 1mm dick, für die Dichtung

Zuerst werden Schlitzformer, kleine Kunststoffquader (10 x 2 x 1mm), mit einem Zweikomponentenkleber (Uhu Plus) auf eine Glasplatte geklebt. Auf eine Glasplatte klebt man 5 solcher Kunststoffstücke, so daß vom Dichtungsrand bis zum Schlitzformer ein Freiraum von mindestens 10mm bleibt und zwischen den Schlitzformern gleiche Abstände liegen (Abb.2).

Aus einem Stück Parafilm (10 x 15cm) werden mit einer Rasierklinge oder mit einem Skalpell die Aussparungen für die Schlitzformer geschnitten, so daß sich der Parafilm glatt auf die Glasplatte mit den aufgeklebten Schlitzformern legen läßt. Der Parafilm wird mit einer Seite mit Paraffin eingerieben und mit dieser Seite fest auf die Glasplatte gedrückt. (Eine genauere Anpassung an die Schlitzformer gelingt, wenn die Glasplatte zuerst mit Parafilm überzogen wird, die Aussparungen für die Schlitzformer ausgeschnitten und die Schlitzformer dann aufgeklebt werden.) Die überstehenden Teile des Parafilms werden auf die andere Seite der Glasplatte umgeschlagen. Eventuell vorhandene Luftblasen werden zum Rand hin ausgestrichen. Die Gummidichtung wird auf die mit Parafilm versehene Platte gelegt. Darüber legt man dann eine silanisierte Glasplatte (Silanisieren: zu einem Gemisch bestehend zu gleichen Volumenteilen aus dest. Wasser und Äthanol wird Desaga Polyfix 1000 zugegeben, so daß es in einer 0,2%igen Lösung vorliegt; gereinigte und mit Aceton entfettete Glasplatten werden 5 min lang in diese Lösung gelegt und im Anschluß daran getrocknet). Die Glasplatten werden mit Klammern am Rand zusammengedrückt und senkrecht gestellt, so daß die Gelform von oben gefüllt werden kann (auch Wäscheklammern sind verwendbar).

Materialien zum Gießen der Gele:

eine 20ml Spritze, dazu eine 10cm lange Kanüle mit einem Durchmesser von 1mm

Reagentien: 1) Tris(hydroxymethyl)aminomethan als Base
2) Acrylamid (Serva 10675)
3) BIS=N,N'-methylen-bis-acrylamid (Serva 29195)
4) TEMED=N,N,N',N'-tetramethyläthylendiamin (Serva 35925)
5) Riboflavin
6) Saccharose
7) Ammoniumpersulfat (Serva 13375)
8) Glycin (Merck 4201)
9) Natriumazid (Merck 6688)
10) Serva Blau G (Serva 35050)

Methanol, Eisessig und Trichloressigsäure

Lösungen: 1) Tris-Glycin-Puffer-Stammlösung pH 8,9:
30,08g Glycin, 1,0g Natriumazid und Tris. Glycin und Natriumazid wurden in 1500ml dest. Wasser gelöst und mit Tris auf einen pH von 8,9 titriert und auf 2000ml aufgefüllt.

2) 22,2g Acrylamid und 0,6g BIS wurden in dest. Wasser gelöst und auf 100ml aufgefüllt. Das Gefäß war mit Aluminiumfolie umwickelt worden.

3) 70mg Persulfat wurden in 50ml dest. Wasser gelöst (Lösung immer frisch angesetzt). Auch

höhere Konzentrationen (0,15g/10ml) stören nicht bei der Elektrophorese, gewährleisten aber eine gleichmäßige Polymerisation.

4) 2,99g Tris wurden in 45ml dest. Wasser gelöst und der pH auf 6,7 eingestellt. Zum Gemisch wurden 0,23ml TEMED gegeben und mit dest. Wasser auf 50ml aufgefüllt. Im Eiswasserbad wurde der pH auf genau 6,7 eingestellt.
5) 5g Acrylamid und 1,25g BIS wurden in dest. Wasser gelöst und auf 50ml aufgefüllt. Das Gefäß wurde mit Aluminiumfolie umwickelt.
6) 4mg Riboflavin wurden in 100ml dest. Wasser gelöst.
7) 40g Saccharose wurden in dest. Wasser gelöst und auf 100ml aufgefüllt. Die Lösung wurde im Eisfach gelagert.
8) Probenpuffer: 5ml Lösung 1) wurden mit dest. Wasser auf 100ml aufgefüllt.
9) Elektrodenpuffer: ein Raumteil Lösung 1) und ein Raumteil dest. Wasser.
10) Proteinfixierlösung: 20%ige Trichloressigsäure.
11) Proteinfärbelösung: 0,15%ige Serva Blau G Lösung, gelöst in Methanol:Eisessig:Wasser (45:10:45 V/V).
12) Entfärbelösung: Methanol:Eisessig:Wasser (25:10:65 V/V).

Sammelgellösung: 1ml Lösung 4), 2ml Lösung 5), 1ml Lösung 6) und 4ml Lösung 7).
Bei dieser Sammelgelzusammensetzung ist T=3,12%, C=20% und pH 6,7.

Trenngelmischverhältnisse:

	T=5% C=2,6%	T=6% C=2,6%	T=7,5% C=2,6%	T=10% C=2,6%
Lösung 1)	5,5ml	5,5ml	5,5ml	5,5ml
Lösung 2)	2,5ml	2,89ml	3,75ml	5ml
Lösung 3)	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml
TEMED	15ul	15ul	15ul	15ul
dest.Wasser	2,5ml	2,5ml	2,5ml	2,5ml

Gießen der Gele:

Die senkrecht stehende Gelform wurde zuerst mit 2,5ml Sammelgellösung gefüllt und vorsichtig mit dest. Wasser (ca. 1ml) überschichtet, damit sich eine gerade Oberfläche bildete. Anschließend wurde mit einer Kaltlichtlampe oder bei Tageslicht polymerisiert. Nach 30 min sollte die Polymerisation abgeschlossen sein. Die Gelform wurde dann gekippt, das Wasser mit der Spritze abgesaugt, und danach bis zum Rand mit der Trenngellösung gewünschter Konzentration gefüllt. Die Gele wurden in ein feuchtes Tuch geschlagen und nach Möglichkeit am nächsten Tag ver-

wendet.

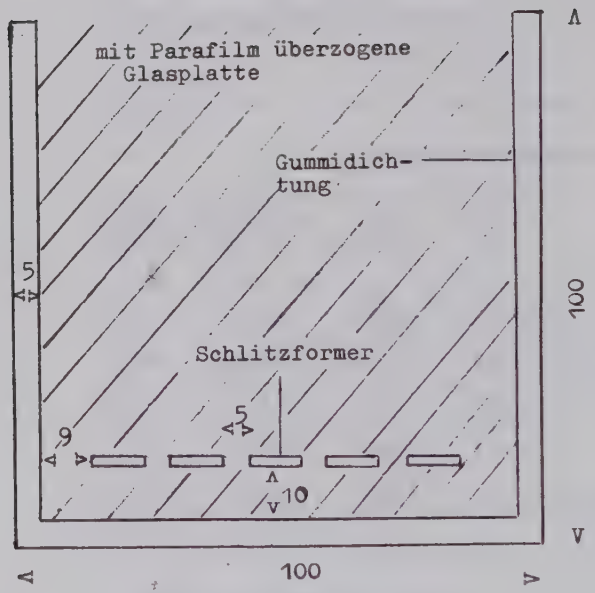


Abb.2: Skizze der Gelform
Zahlenangaben in mm.

Elektrophoreselauf:

Die mit Parafilm beschichtete Glasplatte wurde vorsichtig von der anderen Glasplatte mit dem daran haftenden Gel abgehoben, indem man vom Rand her Luft dazwischen strömen ließ. Das Gel auf der Glasplatte wurde dann auf den Kühlblock der Elektrophoresekammer gelegt. Die Pufferbrücken, die mit Puffer gut durchtränkt waren, wurden ca. 10mm weit auf das Gel gelegt und zur besseren

Auflage auf dem Gel mit einer Glasplatte beschwert. Vor dem Auftragen der Proben wurde eine 15 min lange Vorelektrophorese bei 20 V/cm durchgeführt. Die aufgetragene Proteinmenge sollte zwischen $1,4\text{-}3,5 \times 10^{-4}$ g (ca. 2-5ul Plasma) liegen. Für die Plasmaelektrophorese wurden 10ul Plasma mit 10ul Probenpuffer gemischt und 10ul von dem Gemisch in den Schlitz pipettiert. Die Elektrophorese wurde dann unter Wasserkühlung bei 20 bzw. 40 V/cm gestartet. In die Schlitze können auch kleine Gewebsproben in abgewogenen Mengen gefüllt und so einer direkten Gewebselektrophorese unterzogen werden.

Nach dem Lauf wurden die Gele 120 min in Proteinfixierlösung 10) gelegt und anschließend im Färbebad 11) 45 min lang gefärbt. Entfärbt wurde 24 Stunden lang unter mehrfachem Wechsel der Entfärbelösung.

2.2.2.3. Elektrophoresen von Aortenhomogenaten und direkte Gewebselektrophoresen von Carotis- und Aortengewebe

Für die Aortenhomogenate wurde die Aorta gleich nach der Exzision vom anhängenden lockeren Bindegewebe befreit und in einem Gemisch aus 50ul 0,9%iger NaCl-Lösung und 450ul dest. Wasser homogenisiert. Das Homogenat wurde zentrifugiert und der Überstand abpipettiert und lyophilisiert. Für die Elektrophorese wurde das lyophilisierte Protein in Probenlösung gelöst und mit Hilfe der Gelelektrophorese untersucht.

Für die direkte Gewebselektrophorese (Mittelbach et al. 1969, Smith und Slater 1972) wurden die kleingeschnittenen Gefäßstücke in abgewogenen Mengen in die Geltaschen eingebracht und mit Probenpufferlösung bedeckt. Zur leichteren Beurteilung der Proteinbanden wurde im selben Lauf auch eine Plasmaprobe mitlaufen gelassen. Der Lauf wurde bei 20 bzw. 40 V/cm (400 bzw. 800 Volt zwischen Anoden- und Kathodenpuffer) durchgeführt.

2.2.2.4. Auswertung der Elektrophoresen

Elektrophoresen auf Celluloseacetatfolien, bei denen es darum ging, mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Proteine nachzuweisen, wurden nicht gefärbt, sondern mit dem Föhn getrocknet und mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Flachgele aus Polyacrylamid waren geeignet für die Auswertung mit dem Densitometer, wobei die Extinktion kontinuierlich gemessen und die Kurve mit einem Plotter aufgezeichnet wurde. Die Extinktion wurde bei 575 bzw. 570nm gemessen. Bei Elektrophoresen von Plasma, das Evans-Blau enthielt, wurden die Gele direkt nach dem Lauf kurz mit dest. Wasser abgespült, mit einem Föhn 5 min getrocknet und anschließend sofort densitometrisch ausgewertet. Danach erfolgte der Fixier- und Färbevorgang.

Für die quantitative Auswertung mußte die Fläche unter den Kurvengipfeln bestimmt werden. War an das Densitometer ein Integrator angeschlossen, ließ sich die Fläche

unmittelbar aus der Kurve ablesen. Bei den Kurven, die mit Densitometer ohne Integrator aufgezeichnet wurden, wurde die Fläche durch Ausschneiden und Wiegen des Papiers bestimmt.

2.2.3. Nachweis der Fluoreszenz im Gewebe mit dem Fluoreszenzmikroskop anhand von Gefrierschnitten

Da die Gefrierschnitte mit dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Standard 14 mit Fluoreszenzeinrichtung und Aufsatzkamera MC 63) betrachtet wurden, war es notwendig, ein Einbettmaterial zu finden, das möglichst keine Eigenfluoreszenz besitzt. Carboxymethylcellulose erfüllte diese Anforderung.
Sofort nachdem die Carotissegmente aus den Kaninchen entnommen waren, wurden sie auf in der Kühltruhe vorgekühlte Metallblöcke gebracht und mit Einbettmaterial umgeben. Im Anschluß daran wurden die Gefäße sofort tiefgekühlt. Mit dem Gefriermikrotom (Reichert-Jung Mod. 2700-Frigocut) wurden dann 7 bis 10um dicke Querschnitte vom gesamten Gefäßsegment angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden im Exsikkator mit Kieselgel als Trockenmittel langsam auf Zimmertemperatur erwärmt. Danach konnten sie mit dem Mikroskop ausgewertet werden.

Für die Mikroskopie waren folgende Filterkombinationen vorhanden:

	Anregung	Farbteiler	Langpaß
1)	450-490nm	510nm	520nm
2)	395-425nm	425nm	450nm
3)	510-560nm	580nm	590nm

2.3. Beschreibung von Operations- und Untersuchungsabläufen

2.3.1. Versuchstiere

31 Versuchstiere, männliche Neuseeland Albinokaninchen mit einem Körpergewicht zwischen 1,8 und 4 kg, wurden verwendet. Die Tiere waren mit einer Standarddiät der Firma Altromin, D-3981 Lage, und wasser ad libitum gefüttert.

2.3.2. Elektrostimulation der Arterienwand

Nach Narkotisierung mit Natrium-Pentobarbital (40mg/kg Körpergewicht) wurden die Tiere im Operationsgebiet, d.h. in der ventralen Halsregion, rasiert. Auf beiden Seiten wurde die Arteria carotis communis freipräpariert. Um die eine wurde eine Teflonmanschette, die zwei Goldelektroden enthielt, gelegt und mit einem Faden gegen Verrut-

schen gesichert. Die beiden Pole der Manschette sollten genau gegenüberliegenden Stellen des Gefäßes anliegen. Die Pole der Elektrode wurden dann mit den Ausgängen am Reizgerät verbunden. Das Operationsgebiet wurde während der Reizung mit einem in physiologischer Kochsalzlösung getränkten Tupfer abgedeckt.

Bei Tieren, die chronisch gereizt wurden, war der Operationsvorgang der gleiche wie oben beschrieben, jedoch wurden die Elektrodenkabel subkutan verlegt und der Verbindungsstecker zum Anschluß der Reizkabel auf der Schädeldecke befestigt (Genaueres zur Versuchsanordnung bei Betz und Schlote 1979). Die Reizparameter für das chronisch gereizte Tier sind unter 2.3.6. angegeben.

Appliziert wurden Rechteckimpulse mit einer Frequenz von 10 Hz. Die Impulsbreite war 1, 10, 15 oder 20 ms pro Impuls. Die Stromstärke wurde auf 10, 50, 100 oder 1000 uA eingestellt. Am häufigsten wurden die Reizparameter 10 Hz, 10 ms Impulsbreite und 100 uA verwendet. Die Form des applizierten Reizes konnte mit einem Kathodenstrahloszillographen aufgezeichnet werden. Die Reize wurden über einen Zeitraum zwischen 10 und 75 min appliziert. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden über eine Ohrvene oder über die Vena jugularis injiziert. Sie zirkulierten zwischen 15 min und mehreren Stunden. Für eventuell auftretende Nebenwirkungen des Pentobarbitals (Atemdepression oder Apnoe) standen Eukraton^{R} und ein Intubationsbesteck für tracheale Beatmung bereit.

Unmittelbar nach der Reizung wurde Blut mit Heparin oder 3,6%iger Natriumcitratlösung als Gerinnungshemmer intracardial abgenommen. Die beiden Aa.carot. com. und die Aorta wurden unter schonender Behandlung entnommen und kurz mit eiskalter Tyrodelösung abgespült. Von der Aorta wurde das anhängende, lockere Bindegewebe unter dem Operationsmikroskop abpräpariert. Die entnommenen Gefäße wurden dann einmal mit Papiertüchern abgetupft und anschließend je nach Verwendungszweck eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

2.3.3. Untersuchungstechnik mit Evans-Blau als Tracer

22 Kaninchen wurde Evans-Blau injiziert. Von 13 in situ Perfusionen wurden Gefrierschnitte angefertigt. Die elektrische Reizung der A.carot.com. wurde in 16 Fällen durchgeführt. Für die Untersuchung des Bindungsverhaltens von Evans-Blau im Plasma wurde 6 Kaninchen ein zentraler Venenkatheter über die Vena jugularis eingeführt. Zwei Experimente dienten ausschließlich dazu, die Bindung von Evans-Blau an Gewebe mit der Gewebselektrophorese zu messen. In zwei Fällen wurde für die Albuminbestimmung in der A.carot.com. eine besonders große Elektrode (s.u.) für die Reizung benutzt. Bei den Experimenten, mit denen der Einfluß der elektrischen Stimulation mittels Gefrierschnitten untersucht wurde, lagen die Evans-Blau Plasmakonzentrationen zwischen 20 und 60 mg/kg Körpergewicht.

2.3.4. Versuche zum Bindungsverhalten von Evans-Blau im Plasma und in der Arterienwand

Bei diesen Versuchen wurde den narkotisierten Kaninchen über die Jugularvene ein Katheter bis ins Herz geschoben. Dieser Katheter ermöglichte beliebig viele Nachinjektionen des Farbstoffs und die Abnahme von Blutproben. Während des Versuchs wurde der Katheter mit einer Infusion (0,9%ige NaCl-Lösung), die über eine Infusionspumpe gesteuert wurde, offengehalten. Steigende Evans-Blau Mengen (1-200 mg/kg Körpergewicht) wurden injiziert, wobei 10 min nach jeder Injektion eine Blutprobe entnommen wurde. Das darin enthaltene Plasma wurde mit der Disc-Elektrophorese untersucht und die Menge an Evans-Blau in den einzelnen Fraktionen, wie unter 2.2.2.4. beschrieben, quantitativ bestimmt. Blaue Areale in den Aa.carot.com. und in der Aorta wurden ausgeschnitten und mit der direkten Gewebselektrophorese (2.2.2.3.) untersucht.

2.3.5. Versuche zum Bindungsverhalten von Evans-Blau im elastischen Gewebe

Nackenband vom Rind (elastisches Gewebe) wurde in kleine Stücke geschnitten und für mehrere Stunden in Evans-Blau Kaninchenplasma (25 mg/kg Körpergewicht) gelegt. Vor und nach dieser Inkubation wurde die Extinktion des Plasmas gemessen. Von den Nackenbandstückchen wurden nach der Inkubation Gewebselektrophoresen gemacht.

2.3.6. Quantitative Albuminbestimmung in der A.carotis communis nach Elektrostimulation

Für die Quantifizierung der Albumingehalte in den Arterienwänden wurden drei Tierversuche durchgeführt. Bei zwei Tieren wurde je eine A.carot.com. mit einer großen (25mm) Elektrode gereizt. Die Elektrode hatte prinzipiell den gleichen Aufbau wie die unter 2.3.2. beschriebene Standardelektrode. Es war jedoch mit dieser möglich, ein für die Gewebsanalyse ausreichend großes Gewebsstück von der Reizstelle zu erhalten. Eine getrennte Untersuchung von anodennaher und kathodennaher Seite ließ die Gewebsmenge allerdings nicht zu. Im dritten Versuch wurde die übliche Elektrode benutzt. Die Operations- und Untersuchungsabläufe entsprachen den unter 2.3.2. beschriebenen. Der Zeitraum, über den die Reizung erfolgte, war in den drei Experimenten unterschiedlich lang, so daß der Einfluß der Reizdauer auf den Albumingehalt der Gefäßwand untersucht werden konnte.

Die Reizparameter in den drei Experimenten waren:

Tier 1): 0,1mA; 10ms/imp.; 10Hz; 65 min Reizdauer; große Elektrode

Tier 2): 0,1mA; 10ms/imp.; 10Hz; 10 min Reizdauer; große Elektrode

Tier 3): 0,1mA; 15ms/imp.; 10Hz; 30 min und 15 min Reizdauer pro Tag über vier Wochen mit der üblichen Elektrode

Jeweils gleiche Mengen Carotisgewebe wurden mit der Gewebselektrophorese untersucht. Die Gele wurden fixiert und gefärbt. Die Albuminzonen der Gele wurden nach dem Anfärben aus dem Gel ausgeschnitten und in 200ul Entfärbelösung homogenisiert und anschließend zentrifugiert. Die Extinktion aus 50ul Überstand in 1000ul Wasser wurde dreimal gegen den Leerwert bei 575nm gemessen.

3. Ergebnisse

3.1. Bindungsverhalten von Evans-Blau im Plasma

3.1.1. Untersuchung mit der Gelchromatographie

Untersucht man Plasma von Tieren, die 25 mg/kg Körpergewicht Evans-Blau erhielten, mit der Gelchromatographie z.B. mit Biogel P-100 (Biorad), so wandert die blaue Zone innerhalb kurzer Zeit durch das Gel. Man kann mit dem Auge bei dieser Konzentration kein freies Evans-Blau im Gel erkennen. Dieses wandert etwa 20fach langsamer durch das Gel als proteingebundenes. Gründe dafür, daß kein freies Evans-Blau im Eluat erkennbar ist, sind zum einen eine zu große Verdünnung bei seiner Wanderung durch die Säule, zum anderen Bindung von freiem Farbstoff an das Gel. Besonders bei der Säulenchromatographie mit Sephadex G-25 war eine hohe Affinität von Evans-Blau zum Gel zu beobachten. Eine Unterscheidung zwischen freiem und proteingebundenem Evans-Blau war hier nicht mehr möglich, da durch die starke Wechselwirkung mit dem Gel der Farbstoff aus seiner Proteinbindung gelöst wird.

3.1.2. Untersuchung mit der Elektrophorese auf Celluloseacetatfolien

Bei dieser Form der Elektrophorese wurde Evans-Blau vom Albumin abgekoppelt, da die Affinität des Farbstoffs zur Folie offensichtlich höher war als die zum Albumin.

3.1.3. Untersuchung mit der Disc-Elektrophorese

Nachdem es gelungen war, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem sich diskontinuierliche Flachgele zur horizontalen Elektrophorese herstellen ließen (s. 2.2.2.2.), war sowohl das Problem der Kühlung gelöst als auch die Auswertung mit dem Densitometer sehr gut möglich geworden. Mit dem angeschlossenen Integrator war zudem die quantitative Auswertung der Densitogramme einfach.
Die Auswertung der Plasmaelektrophoresen mit den verschiedenen Evans-Blau Konzentrationen ergab, daß Evans-Blau sich im Kaninchenplasma immer an zwei Proteine bindet, wovon das eine Albumin ist. Die andere Proteinfraktion wandert im Gel in bezug auf Albumin mit einem R_F=0,79. Der R_F-Wert wurde aus dem Wanderungsverhältnis der beiden Proteine im Trenngel (T=6%) berechnet. Außerdem wurde bei jeder Evans-Blau Plasmakonzentration auch freies Evans-Blau beobachtet, das bei Konzentrationen zwischen 100 und 150 mg/kg Körpergewicht die stärkste Fraktion bildete (Abb. 3 und 4). Das Protein R_F=0,79 hat eine hohe Affinität zu Evans-Blau, was sich daran zeigte, daß es in zwei Plasmaproben, die aus zwei verschiedenen Kaninchen stammten, bei einer Evans-Blau Konzentration von 5 mg/kg bzw. 6 mg/kg Körpergewicht mehr Farbstoff gebunden hatte als Albumin (Tabelle 1). Eine genauere Bestimmung des Proteins konnte freundlicherweise Dr.B.Kerner (DRK Blutspendendienst, Münster) machen, indem er von uns zugesandtes Evans-Blau Kaninchenplasma in Elek-

trophoresesystemen mit Agar und mit Polyacrylamid Gradientgelen (Pharmacia Gradient Gels PAA 4/30) untersuchte. Auf diese Weise konnte einerseits ausgeschlossen werden, daß es sich beim Protein R_F=0,79 um das Dimere von Albumin handelt, andererseits gelang damit auch die Bestimmung des Molekulargewichtes, das bei ungefähr 120000 Dalton liegt.

Mit sinkender Evans-Blau Plasmakonzentration erhöht sich der vom Protein R_F=0,79 gebundene Evans-Blau Anteil. Tabelle 1) zeigt die Ergebnisse aus 6 Injektionsexperimenten.

Bei Messungen der Reaktion von Kaninchenblut mit Evans-Blau in vitro erhält man dieselben Ergebnisse des Bindungsverhaltens wie im Plasma lebender Tiere. Zwischen der Bindung von Evans-Blau im Plasma und im Serum läßt sich kein Unterschied feststellen. Auch im Katzenplasma band sich der Farbstoff an zwei Plasmaproteine. Dagegen zeigte der Farbstoff im Menschen- und Rattenplasma ein anderes Bindungsverhalten; hier wurde er nur an Albumin gebunden. Allerdings war in diesen Plasmaproben auch keine typische Proteinfraktion R_F=0,79 wie bei Kaninchen zu beobachten.

Wurde Evans-Blau in sterilem, destilliertem Wasser gelöst, so waren manche Plasmaproben hämolytisch. Eine frisch hergestellte, wässrige 5%ige Evans-Blau Lösung hat eine Osmolarität von ungefähr 380mosmol/l, d.h. die Osmolarität ist annähernd physiologisch. Eine 5%ige Lösung von Evans-Blau in 0,9%iger NaCl-Lösung hat dagegen

eine Osmolarität von über 600mosmol/l, ist also deutlich hyperton. Man muß demnach bei Evans-Blau Injektionen berücksichtigen, daß die Osmolarität nach Binden des Farbstoffs an Plasmaproteine abnimmt. Weil in Plasmaproben, denen Evans-Blau in physiologischer NaCl-Lösung zugesetzt wurde, keine Hämolyse auftrat, wurde in unseren Experimenten nur Evans-Blau verwendet, das in 0,9% NaCl gelöst war. Die in Tabelle 1) angegebenen Meßdaten wurden also mit 0,9% NaCl gewonnen.

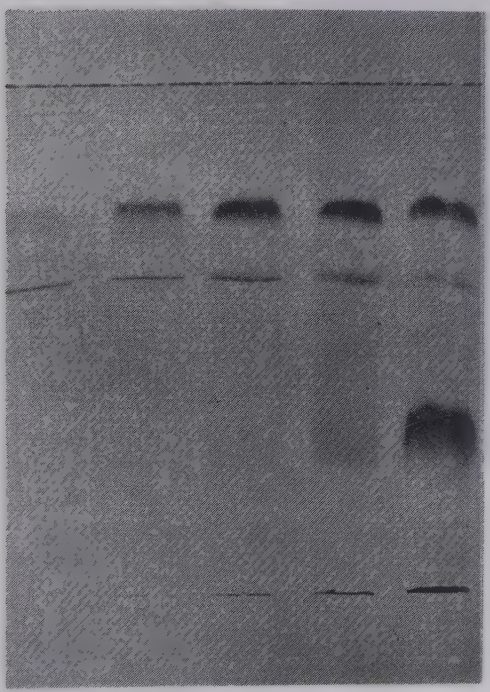


Abb.3: Elektrophorese von Evans-Blau Kaninchenplasma nach in vivo Zirkulation des Farbstoffs. Gel noch ungefärbt. Von links nach rechts: 10, 20, 40, 60 und 160mg Evans-Blau/kg Körpergewicht.

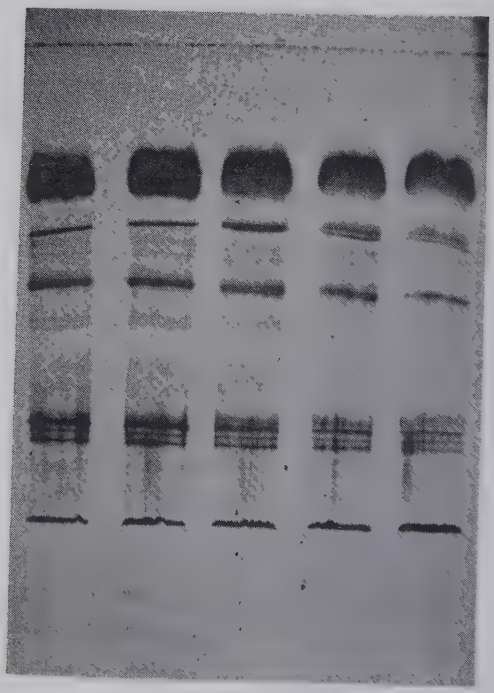
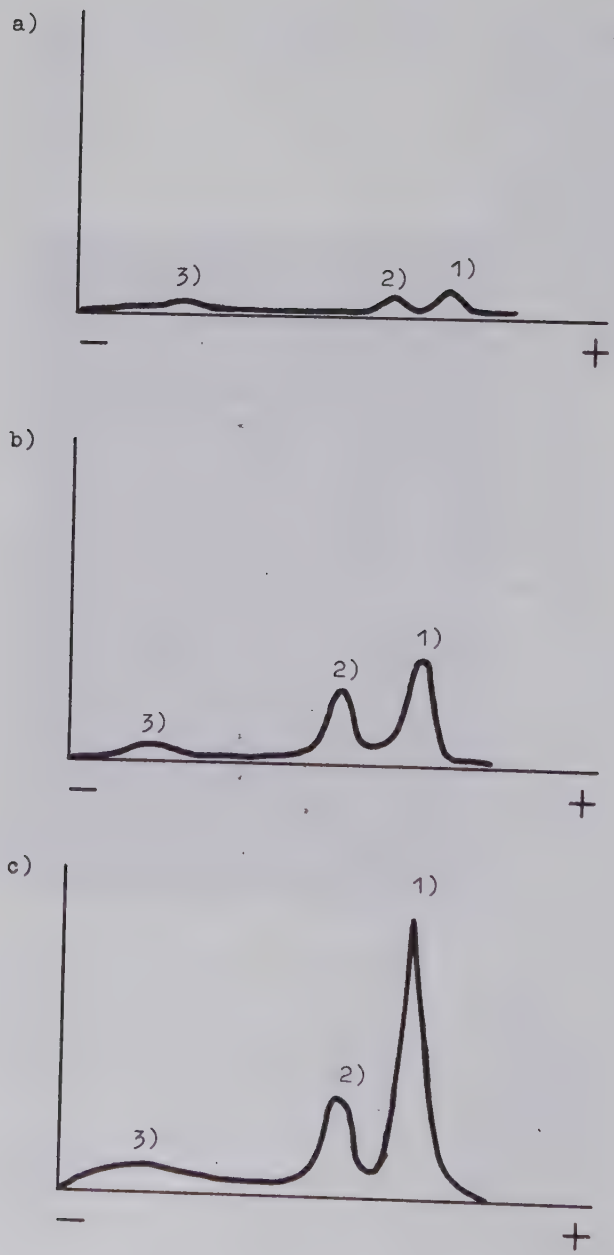


Abb.4: Dasselbe Gel wie in Abb.3 aber nach Anfärben mit Cerva Blau G.

mg Evans-Blau/ kg Körpergewicht	% Evans-Blau gebunden an Albumin	% Evans-Blau gebunden an Protein R_F=0,79	% freies Evans-Blau	% Evans-Blau gebunden an Protein R_F=0,79/ % Evans-Blau gebunden an Albumin
2,5	54,8 ± 13,0	43,5 ± 12,0	1,3 ± 0,8	0,89 ± 0,50
12	59,6 ± 8,7	36,5 ± 10,8	3,9 ± 2,9	0,65 ± 0,29
22	64,5 ± 4,2	27,3 ± 4,7	8,0 ± 3,0	0,43 ± 0,10
35	67,1 ± 5,5	22,9 ± 5,8	9,7 ± 4,3	0,35 ± 0,10
55	53,5 ± 13,4	15,5 ± 4,9	30,5 ± 7,8	0,31 ± 0,17
90	43,7 ± 15,3	9,8 ± 1,9	46,0 ± 16,8	0,23 ± 0,04
150	28,5 ± 7,8	5,5 ± 0,7	66,0 ± 7,1	0,20 ± 0,08

Tabelle 1 (Lindner und Heinle 1982): Der Anteil des Evans-Blau in den drei Fraktionen (freies, albumingebundenes und an Protein R_F=0,79 gebundenes) ist in Abhängigkeit von der Plasmakonzentration dargestellt. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 6 unabhängigen Experimenten. Die Werte wurden mit Hilfe des Densitometerintegrators gewonnen.

Abb.5 a-c



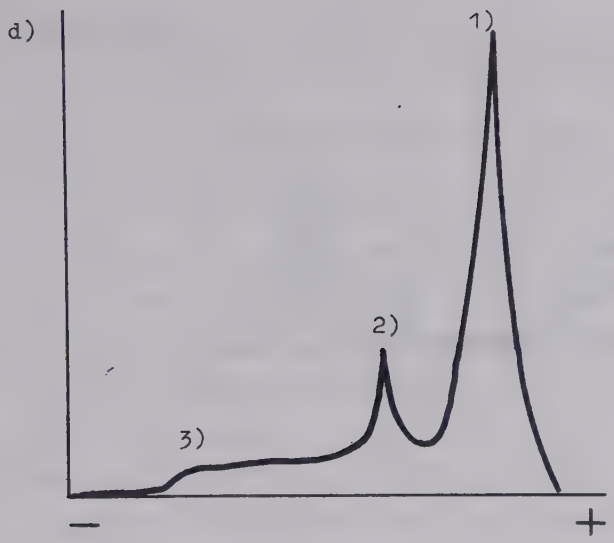


Abb.5 d,e

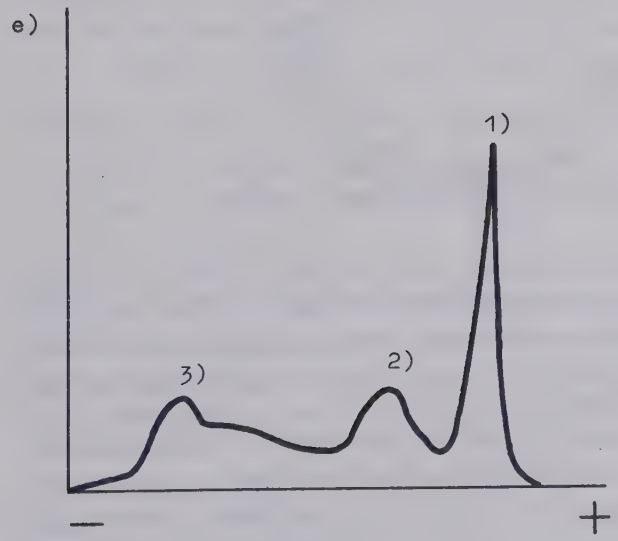


Abb.5 f,g

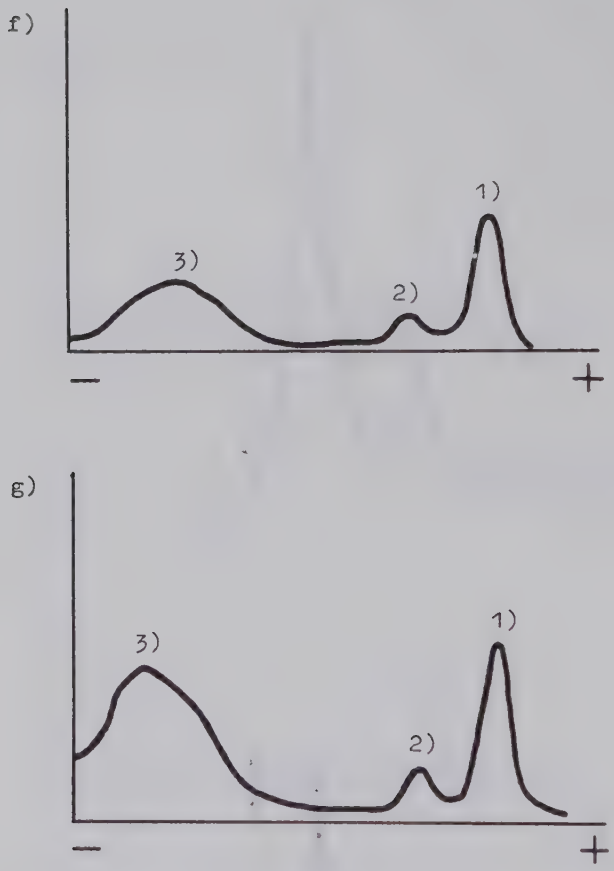


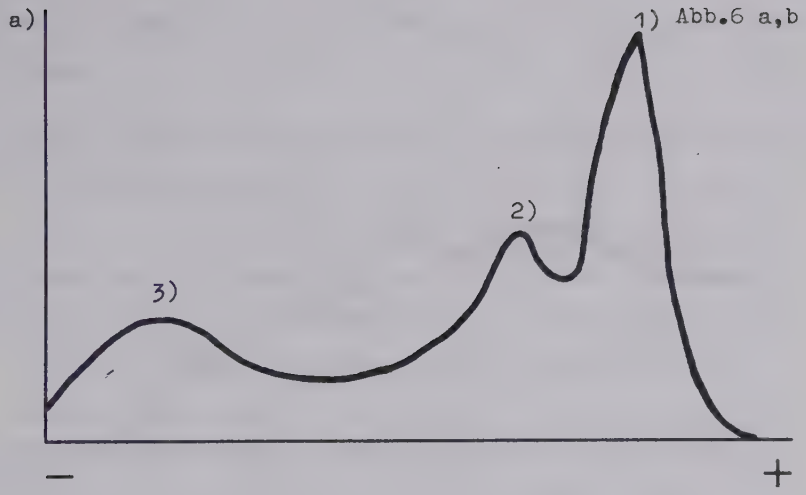
Abb.5 a-g: Densitogramme von Gelen mit verschiedenen Konzentrationen von Evans-Blau im Plasma. Auf der Ordinate ist die Extinktion, die bei 570nm gemessen wurde, aufgetragen. Die Absolutwerte der Extinktion sind nicht miteinander vergleichbar, da die Kurven bei verschiedenen Empfindlichkeitsstufen des Photomultipliers aufgezeichnet wurden. a) 2, b) 10, c) 20, d) 40, e) 60, f) 100 und g) 150 mg Evans-Blau pro kg Körpergewicht. 1) Evans-Blau-Albumin, 2) Evans-Blau-Protein R_F=0,79, 3) freies Evans-Blau.

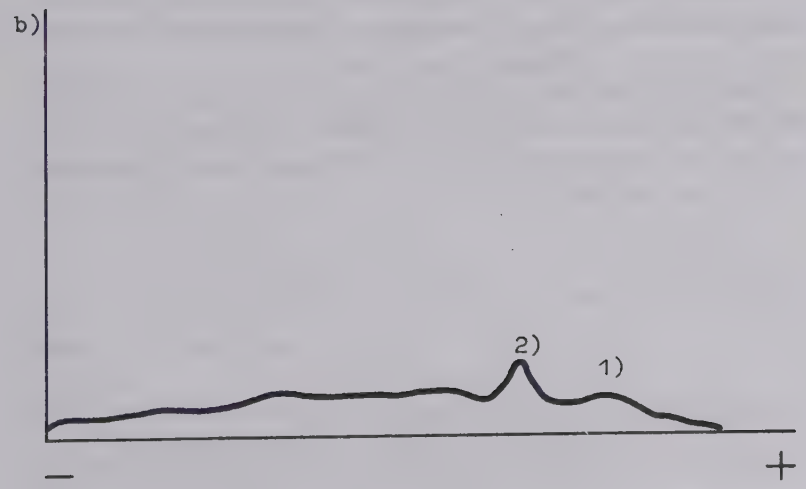
3.2. Bindungsverhalten von Evans_Blau im Gewebe

3.2.1. Bindungsverhalten von Evans-Blau in Gefäßwänden

Zunächst war versucht worden, Evans-Blau aus Arealen der Gefäßwand, die sich während der Zirkulation des Farbstoffs blau angefärbt hatten, zu isolieren. Dazu wurden zunächst von diesen Arealen Homogenate gemacht und der Überstand nach Zentrifugieren mit der Disc-Elektrophorese untersucht. Diese Versuche schlugen jedoch fehl, so daß zur direkten Gewebselektrophorese auf Disc-Gelen übergegangen wurde. Der Vorteil der direkten Gewebselektrophorese gegenüber der Elektrophorese von Homogenatüberständen besteht darin, daß wesentlich weniger Gewebe erforderlich ist, um im Gel Proteinbanden nachweisen zu können. Außerdem werden dabei auch andere Banden erkennbar, die bei der Elektrophorese der Homogenatüberstände nicht zu finden waren. Blaue Areale, die nach der Zirkulation des Evans-Blau bei Konzentrationen geringer als 140mg/kg Körpergewicht aus Gefäßen (Aa.carot.com. und Aorta) mit der Gewebselektrophorese untersucht wurden, setzten keine nachweisbaren Mengen des Farbstoffs frei. Mit dem Densitometer konnte auch bei der empfindlichsten Einstellung kein Evans-Blau-Proteinkomplex nachgewiesen werden. Die Intensität der Blaufärbung der Gewebsstücke ließ bei der Beobachtung mit dem Auge keinen Unterschied zwischen dem Zustand vor bzw. nach dem Lauf erkennen. War dagegen die Konzentration des zirkulierenden Evans-Blau

auf 140mg/kg Körpergewicht oder höher gesteigert worden, so beobachtete man bei der Elektrophorese der blauen Areale eine sehr geringe Freisetzung von Evans-Blau. In diesem Fall wanderte aber mehr Evans-Blau in der Proteinfraktion R_F=0,79 als in der Albuminfraktion, obwohl Albumin in beträchtlichem Maß aus dem Gewebe freigesetzt wurde, was man nach Anfärben der Gele feststellen konnte (Abb.6). Das Gewebe in den Geltaschen blieb aber in jedem Fall intensiv blau gefärbt.


a)
1) Abb.6 a,b
2)
3)
—
+


b)
2)
1)
—
+

c)

Abb.6 c

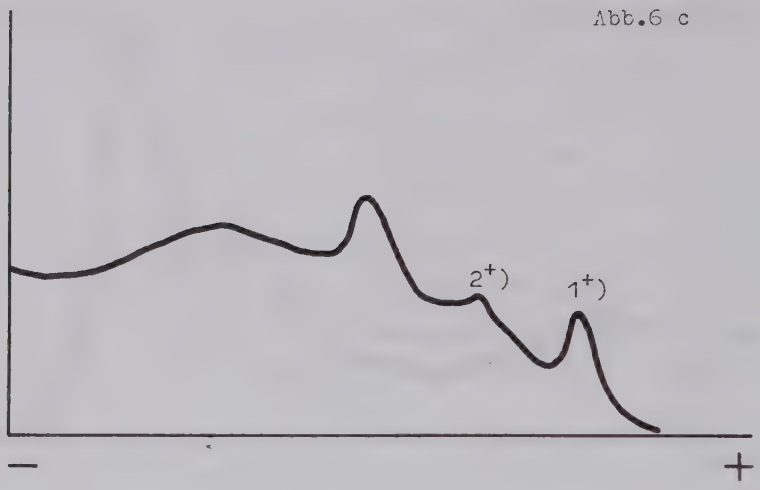


Abb.6 a-c: a) Evans-Blau Kaninchenplasma (40mg/kg), Densitogramm einer ungefärbten Gelelektrophorese. 1) Evans-Blau-Albumin, 2) Evans-Blau-Protein R_F=0,79, 3) freies Evans-Blau.
b) Densitogramm einer Gewebselektrophorese von 20mg Aorta nach Evans-Blau in vivo Injektion (150mg/kg). 1) Evans-Blau-Albumin, 2) Evans-Blau-Protein R_F=0,79.
c) Densitogramm desselben Gels wie bei b), aber nach Anfärben mit Serva Blau G. 1+) Albumin, 2+) Protein R_F=0,79.
Bei allen Densitogrammen wurde die Extinktion (Ordinate) bei 570nm aufgezeichnet.

3.2.2. Bindungsverhalten von Evans-Blau in elastischem Gewebe

Um die Wechselwirkungen zwischen Evans-Blau-Plasmaproteinkomplexen und elastischem Gewebe näher zu untersuchen, wurde elastisches Gewebe aus dem Nackenband vom Rind in Evans-Blau Kaninchenplasma gelegt. Vor dem Hineinlegen des Gewebes ist die Intensität der Blaufärbung des Plasmas (Extinktion) gemessen worden. 18 Stunden nach der Inkubation des Bandes im Evans-Blau Plasma hatte die Extinktion des Plasmas um 35% abgenommen. Das Nackenband wurde nach der Inkubation mit Filterpapier abgetupft, in kleine Stücke geschnitten und eine Gewebselektrophorese davon gemacht. Bei der Elektrophorese wanderte wie beim Aortengewebe mehr Evans -Blau mit der Proteinfraktion R_F=0,79 als mit dem Albumin, obwohl sich die Albuminfraktion nach Anfärben als die größte Bande darstellte. Das elastische Gewebe blieb auch hier nach der Elektrophorese intensiv blau gefärbt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß das Protein R_F=0,79 eine höhere Affinität als Albumin zum Evans-Blau hat.

3.3. Gefrierschnitte der A.carotis communis nach in vivo Evans-Blau Perfusion

Obwohl unterschiedliche Reizparameter wiederholt verwendet wurden, konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Evans-Blau Aufnahme und Reizgröße festgestellt werden.

Deshalb erfolgt die Beschreibung der Ergebnisse unabhängig von den einzelnen Reizgrößen.

Gefrierschnitte:
Es wurden die Gefrierschnitte der Kontrollseite, d.h. Carotissegment mit Manschette ohne Reizung oder ganz ohne Manschette, mit den Schnitten von der gereizten Seite verglichen. Dabei wurde die Anfärbung mit Evans-Blau bei der Anregung mit grünem Licht (510-560nm) als intensive Rotfärbung sichtbar.
Allen Schnitten war gemeinsam, daß die Adventitia deutlich rot fluoreszierte. Dies ist zum Teil durch Evans-Blau plasma in den Vasa vasorum bedingt, könnte aber außerdem durch die bindegewebige Struktur der Adventitia, die Evans-Blau binden kann, verursacht sein.

3.3.1. Gefrierschnitte der Kontrollseite

Diese Schnitte zeigten neben der Fluoreszenz in der Adventitia auch Fluoreszenz in der Intima, die aber in keinem Fall bis in die Media eindrang. In manchen Schnitten fluoreszierte die gesamte Intima, in anderen war fast keine oder nur vereinzelt Fluoreszenz in der Intima vorhanden.

3.3.2. Gefrierschnitte der elektrisch stimulierten Seite

Die Gefrierschnitte waren in bezug auf die Fluoreszenzverteilung recht unterschiedlich. Im Gegensatz zu den Versuchen mit chronischer Reizung (Betz und Schlote,1979) waren die einzelnen Zeiträume, in denen Reize appliziert wurden, bei den hier durchgeführten Experimenten in der Regel länger, meist 75 min.(Betz und Schlote (1979) reizten ein- bis zweimal 30 min pro Tag.) Die Veränderungen am Gefäß sind daher hier meist ausgeprägter.

In vielen Fällen war die Adventitia an der Stelle, an der die Kathode lag, in ihrer Dicke reduziert, bei einer Stromstärke von 1000µA sogar soweit, daß sie nicht mehr eindeutig zu erkennen war (Abb.7,10). Außerdem fällt gegenüber den Kontrollpräparaten auf, daß die Dicke der Media insgesamt eher geringer ist. Besonders unter der Kathode, aber teilweise auch unter der Anode, ist die Media bei Stromstärken von 1000uA stark zusammengeschrumpft, so daß die einzelnen Lamellen der Media verschieden stark verschmolzen erscheinen (Abb.7,10). War die Stromstärke 100µA (Abb.8,9,11,12), sind Schrumpfungen der einzelnen Gefäßwandschichten nicht oder nur sehr schwach ausgeprägt. Die Fluoreszenz an der luminalen Seite der Gefäßwand ist sowohl unter der Kathode als auch unter der Anode sehr deutlich (Abb.8,9), dringt aber unter der letzteren tiefer in die Media ein und ist an dieser Stelle fast in allen Wandschichten zu finden (Abb. 8,12). Diese Befunde waren aber nicht konstant in allen

Präparaten zu erheben. Manche Schnitte waren den Kontrollpräparaten sehr ähnlich, d.h. es waren die oben genannten Veränderungen nur sehr schwach ausgeprägt.
Bei einem Reizgerät wurden die beiden Pole nach jedem Impuls mit der Erde kurzgeschlossen. Es wurde auf diese Weise vermieden, daß sich durch kondensatorähnliche Eigenschaften des Gewebes den einzelnen Impulsen eine Gleichspannung überlagerte. Schnitte von Carotissegmenten, die mit diesem Reizgerät stimuliert worden waren, waren mit den Kontrollpräparaten fast identisch. Es fand sich weder unter der Anode noch unter der Kathode verstärkt Fluoreszenz, und auch Media und Adventitia erschienen unverändert. Allerdings muß berücksichtigt werden, daß das Kurzschließen des Reizgerätes bei gleichen Reizparametern insgesamt weniger Strom liefert, so daß gefolgert werden kann, daß die Stromstärke von entscheidendem Einfluß für den Grad des Eindringens von Evans-Blau in die Gefäßwand ist.
In manchen Präparaten zeigte hauptsächlich die Adventitia eine starke Fluoreszenz (Abb.11). In anderen Präparaten waren solche Veränderungen mehr auf Media und Intima beschränkt, so daß die Fluoreszenz nicht nur unter der Anode und Kathode verstärkt war, sondern die ganze Media zwischen den gegenüberliegenden Polen mehr oder weniger stark fluoreszierte (Abb.10). Dabei konnte die Fluoreszenz der Media sowohl zirkulär die gesamte Media umfassen als auch halbkreisförmig nur auf eine Gefäßwandhälfte beschränkt sein.

Zusammengefaßt bieten die Schnitte der gereizten Seite folgendes Bild:
deutliche Schrumpfung der Adventitia und Media besonders unter der Kathode bei Stromstärken von 1000 uA; gegenüber den Kontrollpräparaten eher eine dünnere Media bei Stromstärken von 100 uA; intensive Fluoreszenz von der luminalen Seite her unter der Kathode und Anode, bei der Anode aber tiefer in die Media eindringend; Fluoreszenz in der Gefäßwand manchmal zirkulär, manchmal halbkreisförmig; Inkonstanz der Befunde.

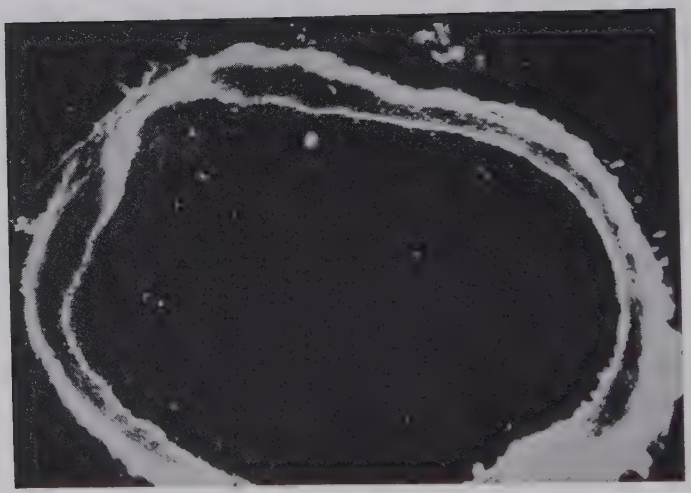


Abb.7: Gefrierschnitt eines elektrisch gereizten Carotissegmentes. Reizparameter: Reizdauer 75 min, Impulsfrequenz 10 Hz, Impulsbreite 10 ms, Stromstärke 1000 uA. Die Kathode lag links oben, dort deutliche Schrumpfung der Gefäßwand. Die Anode lag rechts unten, dort Fluoreszenz in der ganzen Wanddicke.

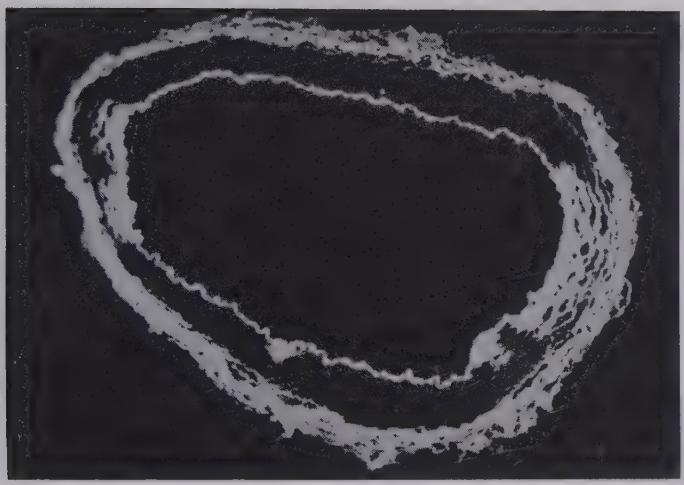


Abb.8: Gefrierschnitt eines elektrisch gereizten Carotissegmentes. Reizparameter: Reizdauer 60 min, Impulsfrequenz 10 Hz, Impulsbreite 10ms, Stromstärke 100 uA. Links lag die Kathode, rechts die Anode. An beiden Polen reicht die Fluoreszenz bis tief in die Media. Fluoreszenz auch in der Intima und Adventitia.

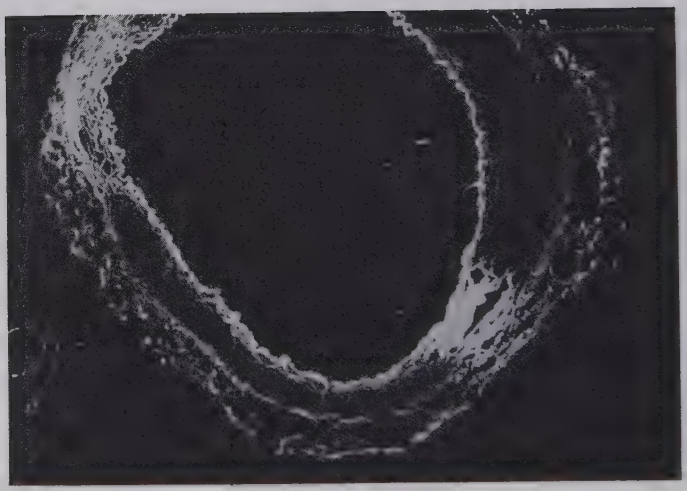


Abb.9: Gefrierschnitt eines elektrisch gereizten Carotissegmentes. Reizparameter: Reizdauer 40 min, Impulsfrequenz 10 Hz, Impulsbreite 10 ms, Stromstärke 100 uA. Links oben lag die Kathode, rechts unten die Anode. An beiden Polen ist Fluoreszenz in der ganzen Media zu finden. Die einzelnen Lamellen der Media sind deutlich zu sehen. Fluoreszenz auch in der Intima.

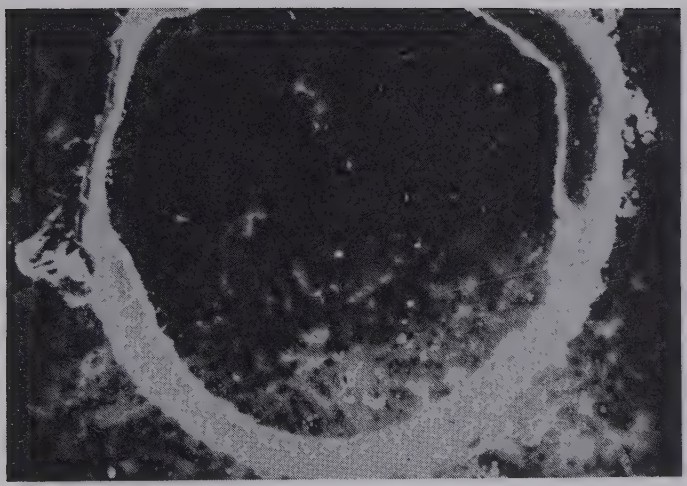


Abb.10: Gefrierschnitt eines elektrisch gereizten Carotissegmentes. Reizparameter: Reizdauer 75 min, Impulsfrequenz 10 Hz, Impulsbreite 10 ms, Stromstärke 1000 uA. Massive Schädigung der Gefäßwand unter der Kathode (links oben). Auch bei der Anode (rechts unten) ist die Gefäßwand geschrumpft. Die Fluoreszenz konzentriert sich auf die untere Hälfte, d.h. halbkreisförmig zwischen Anode und Kathode.

Abb.11: Gefrierschnitt eines elektrisch gereizten Carotissegmentes. Reizparameter: Reizdauer 75 min, Impulsfrequenz 10 Hz, Impulsbreite 10 ms, Stromstärke 100 uA. Bei der Anode (rechts unten) ist Fluoreszenz in der Media zu finden. Zirkulär um das ganze Gefäß herum findet sich in der Adventitia vermehrt Fluoreszenz.

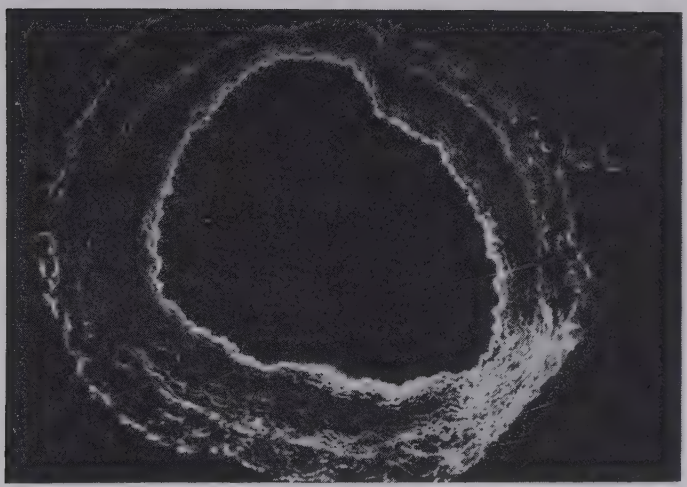


Abb.12: Gefrierschnitt eines elektrisch gereizten Carotissegmentes. Reizparameter: Reizdauer 40 min, Impulsfrequenz 10 Hz, Impulsbreite 10 ms, Stromstärke 100 uA. Die Anode lag rechts unten. Dort Fluoreszenz in der gesamten Media. Die Kathode lag oben in Bildmitte. Dort ist die Media in ihrer Dicke etwas reduziert.

3.4. Bestimmung des Albumingehaltes in stimulierter und nicht stimulierter A.carotis communis

Für die Bestimmung des Albumingehaltes wurde aus den gefärbten Gelen der Gewebselektrophoresen der Carotissegmente die Albuminzone ausgeschnitten. Die an das Albumin gebundene Proteinfarbe wurde in Lösung gebracht und anschließend photometrisch quantifiziert. Jeweils drei voneinander unabhängige Messungen der Extinktion bei unterschiedlicher Verdünnung von paarweise gereizter und ungereizter Seite wurden durchgeführt.
Die Reizparameter zu den einzelnen Tierversuchen sind unter 2.3.6. angegeben.

Tier 1):

gereizte Seite (Extinktion)	ungereizte Seite (Extinktion)
0,295	0,256
0,112	0,100
0,094	0,086

Tier 2):

gereizte Seite (Extinktion)	ungereizte Seite (Extinktion)
0,321	0,280
0,132	0,115
0,114	0,086

Tier 3):

gereizte Seite (Extinktion)	ungereizte Seite (Extinktion)
0,40	0,41
0,168	0,167
0,145	0,160

Bei den für kürzere Zeit stimulierten Aa.carot.com. (Tier 1 und 2) findet sich eher ein höherer Albumingehalt in dem gereizten als in dem ungereizten Gefäß, während sich beim chronisch gereizten Tier 3) kaum ein Unterschied im Albumingehalt der Gefäße findet.
Aufgrund der relativ großen Fehlermöglichkeiten dieser Methode und der sehr geringen Anzahl an Versuchstieren verstehen sich die Ergebnisse jedoch allenfalls als Hinweis, nicht jedoch als definitive Aussage.

4. Diskussion

4.1. Allgemeine Methodenkritik

Den beschriebenen Tracersubstanzen ist gemeinsam, daß sie nach intravasaler Applikation mit geeigneten Methoden in der Gefäßwand oder im perivasalen Gewebe nachgewiesen wurden. Da aber die Vorgänge beim Eindringen von Substanzen in die Gefäßwand nicht statisch sind, sondern kontinuierlich ablaufen, stellt der Nachweis des Tracers im Gewebe nur eine Momentaufnahme dar und gestattet nur eine begrenzte Aussage über den Zeitablauf der Permeation.

Der Nachweis des Tracers im Gewebe ist abhängig von seiner Konzentration dort. Diese wiederum ist sowohl vom Einstrom und Abtransport des Tracers abhängig als auch von dessen Ab- oder Umbau im Gewebe. Wird der Einstrom bei konstantem Abtransport erhöht, und es kommt zur lokalen Kumulation, so kann dies als Folge erhöhter lokaler Permeabilität aufgefaßt werden. Eine Anhäufung des Tracers kann aber auch stattfinden, wenn der Abtransport bei gleichbleibendem Einstrom vermindert ist. Deshalb ist eine Aussage über das Permeabilitätsverhalten aus der Kumulationsänderung des Tracers schwierig; denn welcher Mechanismus zur Tracerkumulation führt, läßt sich bei der hier angewandten Methode nur schwer angeben.

Adams und Bayliss (1977 b) konnten zeigen, daß nicht nur der Einstrom von der luminalen Seite her eine Rolle

spielt, sondern daß auch der Transport von der adventitiellen Seite von Bedeutung ist, womit zum Problem der Permeabilität noch ein weiterer Aspekt hinzukommt. Dies macht noch einmal deutlich, wie komplex das Problem der Permeabilitätsmessung an Gefäßwänden ist.
Will man Einblick in den zeitlichen Ablauf der Permeation von Substanzen bekommen, so muß man eine große Anzahl von Versuchen durchführen, bei denen der Tracer verschieden lange Zeiten auf die Gefäßwand einwirken kann. Nur so ist es möglich, aus den einzelnen Momentaufnahmen den kontinuierlichen Ablauf zu rekonstruieren. Aber auch eine solche Versuchsreihe ist wegen der interindividuellen Variabilität der Versuchstiere unsicher.

4.2. Evans-Blau

4.2.1. Bindungsverhalten von Evans-Blau im Gewebe und Plasma

Die Ergebnisse dieser Arbeit machen klar, daß die Permeabilität des Endothels von Arterien für injiziertes Evans-Blau bei Kaninchen nicht nur in Zusammenhang mit dem Evans-Blau-Albuminkomplex gesehen werden kann. Außer Albumin muß noch ein weiteres Evans-Blau bindendes Plasmaprotein (Protein R_F=0,79) bei der Interpretation der Ergebnisse mit Evans-Blau berücksichtigt werden. Wie auch schon Clasen et al.(1970) erwähnte, ist die Bindung von Evans-Blau an Plasmaproteine eine Gleich-

gewichtsreaktion, so daß jederzeit auch ein Teil des Farbstoffs in freier Form vorliegt und die Möglichkeit der Dissoziation des Evans-Blau-Proteinkomplexes besteht. Mit der Disc-Elektrophorese konnte festgestellt werden, daß der Anteil des freien Evans-Blau auch schon bei relativ geringen Plasmakonzentrationen nicht vernachlässigt werden kann. Daraus resultiert, daß das Anfärben auch durch nicht proteingebundenen Farbstoff mitverursacht sein kann.

Die Tatsache, daß elastische Anteile der Gefäßwand eine hohe Affinität zum Evans-Blau haben, ist mehrfach beschrieben worden (Adams et al. 1977a, Adams u.Bayliss 1977b, Heck et al. 1976, Clasen et al. 1970). Das hier entwickelte Verfahren zur Herstellung von flachen Disc-Gelen mit einer Dicke von 1 mm für die Horizontalelektrophorese ermöglichte unter anderem den Nachweis, daß der größte Anteil der Anfärbung der Gefäßwand auf die Bindung von Evans-Blau an Gewebsstrukturen zurückzuführen ist. Folglich kann auch die Anfärbung des Gewebes nicht mit dem Vorhandensein von diffusionsfähigen Evans-Blau-Plasmaproteinkomplexen gleichgesetzt werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen, zu denen Adams und Bayliss (1977b) mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie gelangte.

Das Plasmapotein R_F=0,79 scheint, obwohl es im Menschenplasma nicht nachweisbar ist und über Untersuchungen an menschlichen Gefäßwänden bezüglich dieses Proteins nichts bekannt ist, zumindest bei Kaninchen in der

Gefäßwand eine Rolle zu spielen. Auffallend ist, daß es sich dabei mit der Gewebselektrophorese in relativ großen Mengen aus der Gefäßwand extrahieren läßt. Daß es eine hohe Affinität zum Evans-Blau hat, zeigt sich besonders darin, daß bei niedrigen Evans-Blau Konzentrationen im Plasma anteilmäßig mehr Farbstoff an dieses Protein gegenüber dem Albumin gebunden ist als bei höheren Konzentrationen. In zwei Fällen war bei niedrigen Evans-Blau Plasmakonzentrationen sogar absolut mehr Farbstoff an das Protein R_F=0,79 gebunden als an Albumin. Die höhere Bindungskapazität des Albumin für den Farbstoff bei gleichzeitig geringerer Affinität im Vergleich zu Protein R_F=0,79 erklärt, daß der Quotient aus den Prozentzahlen des gebundenen Evans-Blau in den beiden Plasmaproteinfraktionen mit steigender Evans-Blau Plasmakonzentration abnimmt (Tabelle 1). Ein weiterer Hinweis auf die hohe Affinität des Proteins R_F=0,79 zum Evans-Blau ist die Tatsache, daß aus den blauen Arealen der Gefäßwand bei der Elektrophorese mehr Evans-Blau mit dieser Proteinfraktion wanderte als mit der Albuminfraktion. Dieser Befund nämlich, daß die Proteinfraktion R_F=0,79 mehr Evans-Blau gebunden hatte als Albumin, obwohl sie im Vergleich dazu in wesentlich geringerer Menge vorhanden war, läßt sich nur so deuten, daß dieses Protein sogar eine höhere Affinität zum Farbstoff hat als Albumin.
Caro et al.(1980) perfundierten die Arteria carotis communis von Kaninchen in situ mit radioaktiv markiertem

Albumin und fanden, daß sich ungefähr nach einstündiger Perfusionsdauer ein Gleichgewicht zwischen Albumin im Plasma und Albumin in der Gefäßwand einstellt. Nimmt man an, daß der Evans-Blau-Albuminkomplex die gleichen Diffusionseigenschaften hat wie Albumin, so würde man erwarten, daß sich die gesamten elastischen Elemente der Gefäßwand nach ungefähr einer Stunde gleichmäßig anfärben würden. Dies ist jedoch nicht der Fall, wie man anhand von Gefrierschnitten unter dem Fluoreszenzmikroskop sieht. Adams (1981) berichtet zwar, daß die unterschiedliche Anfärbung von Plaques mit Evans-Blau bei makroskopischer Betrachtung auf Artefakten beruht, da man mit dem bloßen Auge nur die Anfärbung der unmittelbar unter dem Endothel gelegenen elastischen Lamellen sieht, die im Falle einer Plaque von atheromatösem Material verdeckt sind. Unter dem Fluoreszenzmikroskop im Schnitt betrachtet zeigt jedoch auch die Lamina elastica interna unter der Plaque deutlich Evans-Blau spezifische Fluoreszenz. Die Gefrierschnitte von Carotissegmenten der Kontrollseite in den von uns durchgeführten Versuchen zeigen hingegen durchaus Unterschiede in der Anfärbung der Lamina elastica interna, so daß diese unterschiedliche Anfärbung auch in Zusammenhang mit einer geänderten Affinität der elastischen Komponenten der Gefäßwand zum Evans-Blau diskutiert werden kann.

4.2.2. Gefrierschnitte nach elektrischer Stimulation

Bei der Beurteilung der Gefrierschnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop bei Grünlichtanregung (510-560nm) profitiert man davon, daß der Nachweis roter Fluoreszenz viel empfindlicher ist als der der sichtbaren blauen Farbe des Evans-Blau (Heck et al. 1976).
Die elektrische Reizung der A.carotis communis erlaubt zwar eine genaue Einstellung und Abstufung der Reizparameter, aber die Wirkung auf die Gefäßwand ist offensichtlich nicht streng dosisabhängig. So ist in einem Präparat die Arterie unter der Kathode bei einer Stromstärke von 0,1 mA bis etwa auf ein Viertel der ursprünglichen Wanddicke zusammengeschrumpft, während sie in einem anderen Präparat bei 1 mA und sonst gleichen Reizparametern fast unverändert erscheint. Gute und relativ gleichmäßige Resultate wurden bei einer Stromstärke von 0,1 mA, einer Reizbreite von 10 ms pro Impuls und einer Impulsfrequenz von 10 Hz erzielt. Gründe für die unterschiedliche Auswirkung gleicher Reizparameter sind:
a) die Größe der Reizmanschette
Die Aa.carot.com. haben nicht immer den gleichen Durchmesser. Bei einer zu großen bzw. zu engen Manschette liegen sich die beiden Pole nicht gegenüber. Dies erklärt möglicherweise die halbkreisförmige Fluoreszenz in Adventitia und Media, die in manchen Präparaten zu beobachten war; denn an Stellen geringeren elektrischen Widerstandes ist der Stromfluß größer und damit auch die direkte Ein-

wirkung des Stromes auf die Gefäßwand. Den geringeren elektrischen Widerstand stellt in diesem Fall die kürzere Entfernung zwischen Kathode und Anode dar.
Ist die Manschette zu eng, kommt zum elektrischen Reiz zusätzlich eine mechanische Belastung hinzu, die durch die Pulswelle noch verstärkt wird und im Sinne einer Stenose die Permeabilität der Gefäßwand in diesem Abschnitt erhöhen kann (Somer et al.1972a).
b) der Austritt von Ödemflüssigkeit aus dem Gewebe im Operationsgebiet in die Umgebung der Manschette Dadurch kann die Leitfähigkeit der Gefäßwand, besonders die der Adventitia, beeinflußt werden. Das Ausmaß des Austritts von Ödemflüssigkeit war sehr unterschiedlich. Ist viel Ödemflüssigkeit ausgetreten, so besteht die Gefahr, daß der Reiz nicht transmural appliziert wird, sondern außen über die Adventitia fortgeleitet wird.
c) Operationsartefakte, z.B. mechanische Schädigungen durch Operationsbesteck. Diese Artefakte wirken sich verständlicherweise im akuten Experiment wesentlich stärker aus als im chronischen. Deswegen sind auch die Resultate im chronischen Experiment etwas einheitlicher.

Die Fluoreszenz war in den meisten Fällen unter der Anode am stärksten. Trotzdem liegt diesem Vorgang wohl nicht nur ein Effekt wie bei der Elektrophorese zugrunde, d.h. negativ geladene Evans-Blau-Plasmaproteinkomplexe und Evans-Blau Moleküle werden an der Anode angereichert. Auch der Einfluß einer sich zwischen Anode

und Kathode aufbauenden Gleichspannung, die sich den einzelnen Impulsen überlagert, scheint die Permeabilität zu beeinflussen. Beim Vergleich zweier Reizgeräte, von denen bei dem einen nach jedem Impuls Anode und Kathode mit der Erde kurzgeschlossen wurden, wurde während der Reizung in situ der zeitliche Verlauf der Spannung mit einem Kathodenstrahloszillograph verfolgt. Dabei stellte sich heraus, daß sich bei dem Reizgerät ohne Kurzschließen nach dem Impuls innerhalb weniger Minuten den einzelnen Impulsen eine Gleichspannung überlagerte, die etwa 20% der maximalen Impulshöhe betrug. Der Impuls hatte bei beiden Reizgeräten nicht die Form eines Rechtecks, sondern glich der Kurvenform, die man beim Aufladen eines Kondensators findet. Bei dem Gerät mit Kurzschließen nach dem Impuls wurde die an der Anode anliegende positive Spannung nach Ende des Impulses kurzzeitig negativ und ging nach Erreichen eines Minimums abrupt auf Null zurück, während sie beim anderen Gerät in Form einer Exponentialfunktion auf den sich aufgebauten Gleichspannungswert abfiel. Diese sich aufbauende Gleichspannung bietet möglicherweise eine Erklärung für die zirkulär und halbkreisförmig angeordnete Fluoreszenz in der Gefäßwand in Adventitia und Media, so daß nicht nur der Elektrophoreseeffekt, sondern auch der direkte Stromfluß eine Permeabilitätserhöhung verursacht. Wird die Stromeinwirkung so hoch, daß die Gefäßwand erhebliche Schädigungszeichen zeigt, wie z.B. bei manchen Präparaten unter der Kathode,

so kommt es hier zur Permeabilitätserhöhung für Evans-Blau und seine Proteinkomplexe, ähnlich wie unter mechanischer Belastung (Fry 1969).

4.3. Albumingehalt der A.carotis communis unter dem Einfluß der Elektrostimulation

In dem 10 und 65 min lang gereizten Gefäß ist der Albumingehalt höher als in den nicht gereizten Gefäßen. Der Albumingehalt des chronisch gereizten Gefäßes scheint gegenüber dem nicht gereizten hingegen unverändert zu sein. Die Ergebnisse aus den drei Tierversuchen verstehen sich allerdings nur als Hinweis, da die verwendete Methode der Albuminbestimmung keineswegs optimal und die Anzahl der Versuchstiere zu gering ist, um eine endgültige Aussage zu machen. Die Meßwerte legen jedoch den Schluß nahe, daß es bei kurzzeitiger Reizung (10 bzw. 65 min) der A.carot.com. zur Erhöhung des Albumingehaltes der Gefäßwand, möglicherweise durch Permeabilitätssteigerung, kommt. Es ist also denkbar, daß in der Frühphase der Entwicklung atherosklerotischer Plaques die Permeabilität für Plasmaproteine (Albumin) erhöht ist. Bei dem chronisch gereizten Gefäß scheint offenbar kein Unterschied gegenüber der nicht gereizten Seite zu bestehen. Um hier genauere Aussagen machen zu können, müßte allerdings zur Albuminbestimmung die Immunelektrophorese verwendet und eine größere Anzahl von Tierversuchen durchgeführt werden.

5. Zusammenfassung

Eine Arteria carotis communis von Kaninchen wurde transmural elektrisch gereizt und die Änderung der Transporte von markierten und unmarkierten Proteinen durch die Gefäßwand untersucht. Die elektrische Reizung des Gefäßes erfolgte mit einer Elektrode, die als Manschette um das Gefäß gelegt wurde. In dieser Manschette lagen sich die beiden Pole der Elektrode genau gegenüber. Mit einem Reizgerät wurden über diese Elektrode Rechteckimpulse appliziert, deren Parameter variiert werden konnten. Während der elektrischen Reizung wurde den Tieren Fluoreszenzfarbstoff in verschieden hoher Konzentration i.v. injiziert. Nach der Elektrostimulation wurden von den Carotissegmenten der gereizten und nicht gereizten Seite Gefrierschnitte angefertigt und mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Evans-Blau erwies sich als der am besten geeignete Tracer in diesen Experimenten, da er sich im Gegensatz zu anderen Tracern (RITC, FITC und Fluorescamin) von der intensiven Autofluoreszenz der elastischen Anteile der Gefäßwand sehr gut abgrenzen ließ. Nach in vivo Injektion von Evans-Blau zeigten die Gefrierschnitte der gereizten Carotissegmente im Bereich der Anode und Kathode Fluoreszenz von der luminalen Seite her, die aber unter der Anode tiefer in die Gefäßwand eindrang und hier teilweise in der ganzen Media zu finden war. In der Adventitia verteilte sich der Farbstoff bei den gereizten Gefäßen genauso wie bei den nicht ge-

reizten Gefäßen. Bei den Kontrollpräparaten war in der Media keine Fluoreszenz zu finden. Ziemlich einheitliche Resultate wurden erzielt, wenn bei der Elektrostimulation die Impulsfrequenz 10 Hz, die Impulsbreite 10 ms und die Stromstärke 100 uA waren. Bei höheren Stromstärken zeigten sich Schädigungszeichen besonders unter der Kathode.

Das Bindungsverhalten im Plasma von Kaninchen wurde mit der Gelchromatographie und verschiedenen Elektrophoresesystemen untersucht. Die Disc-Elektrophorese auf Flachgelen aus Polyacrylamid erwies sich hierbei als geeignete Methode, die leicht dissoziierenden Evans-Blau Proteinkomplexe zu charakterisieren. Die Gele wurden sofort nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung densitometrisch ausgewertet und erst im Anschluß daran fixiert und gefärbt. Die Disc-Elektrophorese auf Flachgelen aus Polyacrylamid wurde auch bei der direkten Gewebselektrophorese von Aorta- und Carotisgewebe verwendet. Diese Elektrophoresen dienten der Untersuchung des Bindungsverhaltens von Evans-Blau in der Gefäßwand. Mit ihnen wurden Gefäßabschnitte, die sich während der in vivo Zirkulation des Farbstoffs blau angefärbt hatten, direkt elektrophoretisch untersucht. Dasselbe Elektrophoresesystem wurde auch bei Versuchen zum Bindungsverhalten von Evans-Blau in elastischem Gewebe (Rindernackenband) und zur quantitativen Bestimmung des Albumingehaltes in gereizten und nicht gereizten Carotissegmenten eingesetzt. Die Quantifizierung des Albumins erfolgte über die Bestimmung der Farbstoffmenge, die nach Anfärben

des Gels in der Albuminzone gebunden war.
Elektrophoresen von Kaninchenplasma, das Evans-Blau enthielt, zeigten, daß sich der Farbstoff an Albumin und an ein zweites Plasmaprotein (R_F=0,79), das im Menschenplasma nicht nachweisbar war, bindet. Bei allen Konzentrationen von Evans-Blau im Plasma war auch freies Evans-Blau vorhanden. Das in den einzelnen Plasmafraktionen enthaltene Evans-Blau wurde bei verschieden hohen Plasmakonzentrationen quantitativ bestimmt und tabellarisch zusammengefaßt. Dabei fiel auf, daß die Proteinfraktion R_F=0,79 eine sehr hohe Affinität zum Evans-Blau hat.

Aus den blauen Gefäßarealen konnte Evans-Blau mit der Gewebselektrophorese nur dann extrahiert werden, wenn die injizierte Menge des Farbstoffs 140 mg/kg Körpergewicht überstieg. Dies verdeutlicht, daß bei Konzentrationen von Evans-Blau im Blut, wie sie in vielen Experimenten eingesetzt wurden, blau gefärbte Areale in der Gefäßwand nicht mit dem Vorhandensein diffusionsfähiger Evans-Blau Proteinkomplexe gleichgesetzt werden können.
Die quantitativen Albuminbestimmungen in Carotissegmenten wiesen darauf hin, daß der Albumingehalt in kurzzeitig stimulierten Gefäßen (10 und 65 min) eher höher ist als in nicht stimulierten.

6. Literaturverzeichnis

ADAMS,C.W.M.,VIRAG,S.,MORGAN,R.S.,and ORTON,C.C., Dissociation of (^{3}H)cholesterol and ^{125}I-labeled plasmaprotein influx in normal and atheromatous rabbit aorta, J.Atheroscler.Res. 8, 679-696 (1968).

ADAMS,C.W.M.,MORGAN,R.S.,and BAYLISS,O.B., The differential entry of (^{125}I)albumin into mildly and severely atheromatous rabbit aortas, Atherosclerosis 11, 119-124 (1970).

(a)ADAMS,C.W.M.,BAYLISS,O.B.,and MORGAN,R.S., Permeability in atherosclerosis, Fluorescence test in green light with Trypan blue, Atherosclerosis 27, 353-359 (1977).

(b)ADAMS,C.W.M.,and BAYLISS,O.B., Permeability of inner and outer layers of rat and rabbit aortic wall. Two new microscopic tests with Trypan blue, Atherosclerosis 26, 419-426 (1977).

ADAMS,C.W.M., Permeability in atherosclerosis, Atherosclerosis 39, 131-132 (1981).

BELL,F.P.,SOMER,J.B.,CRAIG,I.H.,and SCHWARTZ,C.J., Patterns of aortic Evans blue uptake in vivo and in vitro, Atherosclerosis 16, 369-375 (1972).

(a)BELL,F.P.,ADAMSON,I.L.,and SCHWARTZ,C.J., Aortic endothelial permeability to albumin-Focal and regional patterns of uptake and transmural distribution of ^{131}I-albumin in the young pig, Exp.Mol.Path. 20, 57-68 (1974).

(b)BELL,F.P.,GALLUS,A.S.,and SCHWARTZ,C.J., Focal and regional patterns of uptake and the transmural distribution of ^{131}I-fibrinogen in the pig aorta in vivo, Exp.Mol.Path. 20, 281-292 (1974).

BETZ,E. and SCHLOTE,W., Responses of vessel walls to chronically applied electrical stimuli, Basic.Res. Cardiol. 74, 10-20 (1979).

BJÖRKERUD,S. and BONDJERS,G., Endothelial integrity and viability in the aorta of the normal rabbit and rat as evaluated by dye exclusion tests and interference contrast microscopy, Atherosclerosis 15, 285-300 (1972).

BJÖRKERUD,S., Endothelial permeability; interpretations from experimental lesions. Atherosclerosis III. Proceedings of the third international symposium. Ed. by G.Schettler and A.Weizel. Berlin, Heidelberg, New York 1974, 14-20.

BRATZLER,R.L.,CHISHOLM,G.M.,COLTON,C.K.,SMITH,K.A., ZILVERSMIT,D.B.,and LEES,R.S., The distribution of labelled albumin across the rabbit thoracic aorta in vivo, Circ.Res. 40, 182-190 (1977).

CAPLAN,B.A. and SCHWARTZ,C.J., Increased endothelial cell turnover in areas of in vivo Evans blue uptake in the young pig aorta, Atherosclerosis 17, 401-417 (1973).

CAPLAN,B.A.,GERRITY,R.C.,and SCHWARTZ,C.J., Endothelial cell morphology in focal areas of in vivo Evans blue uptake in the young pig aorta, Exp.Mol.Path. 21, 102-117 (1974).

CARO,C.G.,LEVER,M.J.,LAVER-RUDICH,Z.,MEYER,F.,LIRON,N., EBEL,W.,PARKER,K.H.,and WINLOVE,C.P., Net albumin transport across the wall of rabbit common carotid artery perfused in situ, Atherosclerosis 37, 497-511 (1980).

CHARMAN,R.C. and BRAEULER,C., An evaluation of cellulose acetate electrophoresis for the determination of human plasma lipoprotein patterns, Atherosclerosis 17, 483-489 (1973).

CLASEN,R.A.,PANDOLFI,S.,and HASS,G.M., Vital staining serum albumin and the blood-brain barrier, J.Neuropath.Exper.Neurol. 29, 266-284 (1970).

CRANE,W.A.J. and INGLE,D.J., Tritiated thymidine uptake in rat hypertension, Arch.Path. 78, 209-221 (1964).

DUNCAN,L.E.,BUCK,K.,and LYNCH,A., Lipoprotein movement through canine aortic wall, Science 142, 972-973 (1963).

EITEL,W.,SCHMID,G.,SCHLOTE,W.,and BETZ,E., Early arteriosclerotic changes of carotid artery wall induced by electrostimulation. A study by scanning and transmission electron microscopy. Path.Res.and Pract. 170, 211-229 (1980).

FRY,D.L., Certain chemical responses of the vascular interface to acutely induced mechanical stress in the aorta of the dog, Circ.Res. 24, 93-108 (1969).

HANSEN,N.P. and NIELSON,N.C., The binding of Evans blue to plasma proteins; an evaluation using adsorption onto Sephadex, Scand.J.Lab.Invest. 16, 491-497 (1964).

HECK,A.F.,HASUO,M.,FURUSE,M.,BROCK,M.,and DIETZ,H., Distribution of serum protein labeled with Evans blue in the wall of extra-and intracranial blood vessels of the cat, Atherosclerosis 23, 227-238 (1976).

HOLLANDER,W., Recent advances in experimental and molecular pathology- Influx, synthesis and transport of arterial lipoproteins in atherosclerosis, Exp.Mol.Path. 7, 248-258 (1967).

HÜTTNER,J.,BOUTET,M.,and MORE,R.H., Passage of fine-structural protein tracers through arterial endothelium during period of catecholamine and mechanically induced high and low blood pressure, Am.J. Path. 66, 46a (1972).

HÜTTNER,J.,BOUTET,M.,and MORE,R.H., Studies on protein passage through arterial endothelium, Lab.Invest. 28, 678-685 (1973).

JELLINEK,H., Arterial lesions and arteriosclerosis. Publishing House of the Hungarian Academy of Sciences (Akadémia Kiadó). Budapest, 130-134 (1974).

KERENYI,T.,DENES,R.,LEHMANN,R.,JELLINEK,H.,DETRE,Z.,and HAUSS,W.H., Vascular permeability disturbance and cell activity, Atherogenese 3, 45-52 (1978).

KLATZO,I.,MIQUEL,J.,and OTENASEK,R., The application of fluorescein labeled serum proteins (FLSP) to the study of vascular permeability in the brain. Acta.Neuropath.(Berlin) 2, 144-160 (1962).

KUROZUMI,T., Electron microscopy study on the permeability of the aorta and basilar artery of the rabbit-with special reference to the changes of permeability by hypercholesteremia, Exp.Mol.Path. 23, 1-11 (1975).

LINDNER,V.,TARCZY,M.,and HEINLE,H., Evans blue binding in arterial vessel walls and to plasma proteins following dye injection in rabbits, Pflügers Archiv 391, R42 (1981).

LINDNER,V. and HEINLE,H., Binding properties of circulating Evans blue as determined by disc electrophoresis, Atherosclerosis 43, 417-422 (1982).

MARKUS,P. and BAUMBERGER,J.P., A polarigraphic study of Evans blue and its combination with plasma proteins, J.Biol.Chem. 206, 59-65 (1954).

MAURER,H.R., Disc-electrophoresis and related techniques of polyacrylamide·gel electrophoresis, W.de Gruyter Berlin,New York (1971).

MCGILL,H.C.,GEER,J.C.,and HOLMAN,R.L., Sites of vascular vulnerability in dogs demonstrated by Evans blue, Arch.Path. 64, 303-311 (1957).

METCALF,T.G., Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum, Am.J.Pathol. 34, 1081-1087 (1958).

MITTELBACH,F.,ANTL,W. und HAMBURGER,K., Modifikation der Disc-Elektrophorese zur direkten Gewebselektrophorese von Kryostatschnitten bioptisch gewonnener Gewebeproben, Z.klin.Chem.u.klin.Biochem. 7, 189-193 (1969).

PACKHAM,M.A.,ROWSELL,H.C.,JØRGENSEN,L.,and MUSTARD,J.F., Localized protein accumulation in the aorta, Exp.Mol.Path. 7, 214-232 (1967).

RAWSON,R.A., The binding of T-1824 and structurally related diazo dyes by plasma proteins, Am.J.Physiol. 137, 708-717 (1943).

SCHLOTE,W.,BOELLAARD,J.W.,and BETZ,E., Experimental atherosclerosis- the animal model and its relation to the human disease, Folia Angiologica 28, 76-79 (1980).

SCHMID,G., Permeabilität der Arterienwand bei tierexperimenteller Arteriosklerose, Das Gefäßendothel, ed.H.Fischer und E.Betz, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH,Stuttgart 1981, 96-106.

SMITH,E.B. and SLATER,R.S., Relationship between low density lipoproteins in aortic intima and serum lipid levels, The Lancet Feb.26, 189-193 (1972).

SMITH,E.B. and STAPELS,E.M., Distribution of plasma proteins across the human aortic wall, Barrier functions of endothelium and internal elastic lamina, Atherosclerosis 37, 579-590 (1980).

SOMER,J.B. and SCHWARTZ,C.J., Focal (^{3}H)cholesterol uptake in the pig aorta, Atherosclerosis 13, 293-304 (1971).

(a)SOMER,J.B., EVANS,G., and SCHWARTZ,C.J., Influence of experimental aortic coarctation on the pattern of aortic Evans blue uptake in vivo, Atherosclerosis 16, 127-133 (1972).

(b)SOMER,J.B. and SCHWARTZ,C.J., Focal ^{3}H-cholesterol uptake in pig aorta. Distribution of ^{3}H-cholesterol across the aortic wall in areas of high and low uptake in vivo, Atherosclerosis 16, 377-388 (1972).

SOMER,J.B. and SCHWARTZ,C.J., Focal differences in lipid metabolism of the young pig aorta, Atherosclerosis 20, 11-21 (1974).

STEHBENS,W.E., Endothelial permeability in experimental aneurysms and arteriovenous fistulas in rabbits as demonstrated by the uptake of Evans blue, Atherosclerosis 30, 343-349 (1978).

STEIN,O. and STEIN,Y., An electron microscopic study of the transport of peroxidases in the endothelium of mouse aorta, Z.Zellforsch. 133, 211-222 (1972).

STEINWALL,O. and KLATZO,I., Selective vulnerability of the blood-brain barrier to chemically induced lesions, J.Neuropath.Exp.Neurol. 25, 542-559 (1966).

STEFANOVICH,V. and GORE,I., Cholesterol diet and permeability of rabbit aorta, Exp.Mol.Path. 14, 20-29 (1971).

TARCZY,M., HEINLE,H., and LINDNER,V., Early changes of vascular permeability after electrical stimulation of the common carotid artery, Pflügers Archiv 389, R17 (1981).

THORGEIRSSON,G. and ROBERTSON,A.L., The vascular endothelium - pathobiological significance, Am.J.Path. 93, 803 (1978).

VENKATACHALAM,M.A. and FAHIMI,H.D., The use of beef liver catalase as protein tracer for electron microscopy, J.Cell.Biol. 42, 480-489 (1969).

WRIGHT,H.P. and PAYLING,H., Mitosis patterns in aortic endothelium, Atherosclerosis 15, 93-100 (1972).

WRIGHT,H.P.,EVANS,M.,and GREEN,R.P., Aortic endothelial mitosis and Evans blue uptake in cholesterol-fed subscorbutic guinea-pigs, Atherosclerosis 21, 105-113 (1975).

Herrn Prof.E.Betz und Dr.H.Heinle danke ich bestens für die Überlassung des Themas und ihre fachliche Unterstützung.
Herrn Dr.M.Tarczy, der bei der Durchführung der Tierversuche behilflich war, gilt ebenfalls mein Dank.

Lebenslauf

Am 4. Juni 1958 wurde ich, Volkhard Lindner, als Sohn des Heinrich Lindner und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Jecht, in Gevelsberg (Ennepe-Ruhr-Kreis) geboren.

Nach der Schulzeit, die ich 1977 in Marl mit dem Abitur an einem Gymnasium mit reformierter Oberstufe abschloß, begann ich im Wintersemester 1977/78 das Medizinstudium in Homburg/Saar, von wo ich nach der ärztlichen Vorprüfung zum Wintersemester 1979/80 nach Tübingen wechselte. Dort begann ich im Sommersemester 1980 mit der Doktorarbeit am Physiologischen Institut (I). Im selben Institut war ich im Wintersemester 1981/82 als wissenschaftliche Hilfskraft tätig. Über den Rahmen der Doktorarbeit hinaus arbeitete ich weiter an der Untersuchung des Bindungsverhaltens von Evans-Blau im Gewebe. Das Studium beendete ich an der Universität Tübingen am 9. April 1984 mit dem Staatsexamen.